

Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt,  
Klinikum der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff

**Therapie der Spondylitis ankylosans  
mit dem monoklonalen chimären anti-TNF-Antikörper  
Infliximab (Remicade®):  
Klinische Wirksamkeit und  
Einfluss auf die HLA-Oberflächenexpression auf Lymphozyten  
mit besonderer Berücksichtigung von HLA-B27**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Heidrun Wittwer  
aus Hindelang

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Herbert Kellner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Jansson  
Prof. Dr. med. Wank

Mitbetreuung durch  
den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Rudolf Gruber

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2004

**gewidmet allen Patienten,  
denen ich während meiner ärztlichen Tätigkeit  
begegnen werde**

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>I.1. Spondylitis ankylosans</b>	<b>1</b>
I.1.1. Epidemiologie	
I.1.2. Klinische Manifestation	
I.1.3. Histopathologie	
I.1.4. Diagnose	
I.1.5. Therapie	
I.1.6. Prognose	
<b>I.2. HLA-B27</b>	<b>6</b>
I.2.1. HLA-B27-Subtypen	
I.2.2. HLA-B27 und Spondylitis ankylosans	
<b>I.3. Tumor Nekrose Faktor (alpha)</b>	<b>9</b>
I.3.1. TNF als Schlüsselzytokin der lokalen Immunantwort	
I.3.2. TNF-blockierende Substanzen in der klinischen Anwendung	
<b>I.4. Entwicklung der Fragestellung</b>	<b>13</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
<b>II.1. Ein- und Ausschlusskriterien</b>	<b>14</b>
<b>II.2. Patienten</b>	<b>15</b>
<b>II.3. Zielkriterien</b>	<b>15</b>
<b>II.4. Verlaufsparmeter</b>	<b>15</b>
<b>II.5. Studienmedikation</b>	<b>16</b>
<b>II.6. Durchflusszytometrische Untersuchungen</b>	<b>18</b>
II.6.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	
II.6.2. Durchflusszytometer	
II.6.3. Probanden	
II.6.4. Gewinnung der Lymphozyten aus Frischblut	
II.6.5. Aufbereitung der Lymphozyten für die Durchflusszytometrie	
II.6.6. Antikörper	
II.6.7. Bestimmung der HLA-Oberflächenantigene	
II.6.8. Statistik	
<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>III.1. Eigenschaften der Patientengruppe</b>	<b>25</b>
<b>III.2. Ergebnisse zur klinischen Fragestellung</b>	<b>25</b>
III.2.1. Beeinflussung der klinischen Krankheitsaktivität	
III.2.2. Beeinflussung der laborchemischen Entzündungsparameter	
III.2.3. Beeinflussung des kernspintomografischen Befunds	
III.2.4. Therapiesicherheit und Therapieverträglichkeit	
<b>III.3. Ergebnisse zur experimentellen Fragestellung</b>	<b>32</b>
III.3.1. HLA-B27-Oberflächenexpression	
III.3.2. MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression	
III.3.3. MHC-Klasse-II-Oberflächenexpression	
III.3.4. Quadrantenanalyse	

<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>43</b>
<b>IV.1. Diskussion der klinischen Ergebnisse</b>	<b>43</b>
IV.1.1. Beurteilung der Therapiewirksamkeit von Infliximab bei Patienten mit aktiver Spondylitis ankylosans	
IV.1.2. Beurteilung der Sicherheit und Verträglichkeit von Infliximab bei Patienten mit aktiver Spondylitis ankylosans	
IV.1.3. TNF und Spondylitis ankylosans	
<b>IV.2. Diskussion der experimentellen Ergebnisse</b>	<b>48</b>
IV.2.1. Validität der Ergebnisse	
IV.2.2. Zunahme der Oberflächenexpression von HLA-B27- bzw. MHC-Klasse-I-Molekülen auf Lymphozyten durch wiederholte Therapie mit Infliximab	
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>55</b>
<b>VI. AUSBLICK</b>	<b>56</b>
<b>VII. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>57</b>
<b>VIII. ANHANG</b>	<b>73</b>
<b>VIII.1. visuelle Analogskalen</b>	<b>73</b>
VIII.1.1. BASDAI	
VIII.1.2. BASFI	
VIII.1.3. Schmerzscore	
VIII.1.4. Globales Patientenurteil	
VIII.1.5. Globales Arzturteil	
<b>VIII.2. Vermessungsindex (BASMI)</b>	<b>75</b>
<b>VIII.3. Statistik</b>	<b>76</b>
VIII.3.1. Standardabweichung	
VIII.3.2. Signifikanz	
VIII.3.3. Korrelation	

**verwendete Abkürzungen:**

AK	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
AS	Spondylitis ankylosans
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BASMI	Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index
BASRI	Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index
BKS	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CRP	c-reaktives Protein
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DMARD	disease modifying antirheumatic drug
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme linked Immuno Assay
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FL	Fluoreszenz
HACA	human anti chimeric antibodies
HC	heavy chain
HLA	Humane Leukozyten Antigene
ISG	Ileosakralgelenk
LPS	Lipopolysaccharide
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MTX	Methotrexat
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSAR	nichtsteroidales Antirheumatikum
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Posphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
RA	rheumatoide Arthritis
Rpm	rounds per minutes
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SpA	(seronegative) Spondylarthropathie
STIR	Short tau inversion recovery
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF( $\alpha$ )	Tumor Nekrose Faktor (alpha)
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor

## **I. EINLEITUNG**

Unter dem Begriff der seronegativen Spondylarthropathien oder Spondyloarthritiden (SpA) wird eine heterogene Gruppe entzündlich-rheumatischer Erkrankungen mit gemeinsamen genetischen und klinischen Charakteristika subsumiert (Wright, 1978; Dougados *et al.*, 1991). Im Einzelnen sind dies die Spondylitis ankylosans oder ankylosierende Spondylitis (AS), die reaktive Arthritis, die Arthritis psoriatica, die Arthritis bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (enteropathische Arthropathie) und die undifferenzierten Spondylarthropathien. HLA-B27-positive Personen haben ein 20fach erhöhtes Risiko, im Laufe ihres Lebens an einer SpA zu erkranken (Braun *et al.*, 1998a), wobei bisher noch nicht geklärt werden konnte, welche Rolle HLA-B27 bei der Krankheitsentstehung spielt.

Innerhalb der SpA-Familie weist die AS mit 95 % die höchste HLA-B27-Assoziation auf. Damit ist die AS nach der Narkolepsie, bei der eine HLA-Abhängigkeit bis zu 100 % beschrieben ist (Furuta *et al.*, 2001), die Erkrankung mit der zweitstärksten bisher bekannten HLA-Assoziation überhaupt.

Neben der Beziehung zum HLA-B27-Oberflächenantigen mehrten sich in jüngster Zeit Hinweise auf eine mögliche pathogenetische Rolle des Tumor Nekrose Faktors (TNF) bei der Entwicklung der AS, nicht zuletzt aufgrund der therapeutischen Wirksamkeit von TNF-Hemmstoffen.

### **I.1. SPONDYLITIS ANKYLOSANS**

Die erste klinische Beschreibung der AS geht auf den Londoner Chirurgen Sir Benjamin Collins BRODIE (1783 - 1862) zurück, er schrieb 1850: „Der Verlauf des Leidens war langwierig, erstreckte sich in allen Fällen, wo ich die Kranken überwachen konnte, über einen Zeitraum von mehreren Jahren und endete damit, dass die Wirbelsäule ihre normale Figur behielt, aber über den größeren Teil ihrer Länge vollkommen rigide und unbeweglich blieb“ (Brodie, 1850). Der Leipziger Internist Adolf STRÜMPELL (1853 - 1925) war der erste deutsche Autor, der die AS als eigenständige Erkrankung erkannte und erstmals eine Fotografie eines betroffenen Patienten publizierte (Abb. 1). Es ist bemerkenswert, dass der Neurologe und Psychiater Wladimir von BECHTEREW (1857 - 1927), nach dem diese Erkrankung im deutschsprachigen Raum vornehmlich benannt wird, die AS als Nervenleiden auffasste und damit die Erkrankung falsch kategorisierte (Bechterew, 1893). Erst der Pariser Neurologe Pierre MARIE (1853 - 1940) hat die „Spondylose rhizomélique“ 1898 umfassend definiert und damit die AS gegen andere Erkrankungen der Wirbelsäule und des Nervensystems abgegrenzt (Marie, 1898).

### **I.1.1. Epidemiologie**

In der westlichen Welt wird die Prävalenz der AS in Abhängigkeit von ethnischer Zugehörigkeit und HLA-B27-Frequenz zwischen 0,2 bis 1,4% angegeben (Calin, 1998). Aufgrund einer Diagnoseverschleppung von durchschnittlich sieben Jahren (Feldtkeller, 1999) und der häufigen Fehldiagnose einer seronegativen rheumatoiden Arthritis (RA) im Falle einer peripheren Gelenkbeteiligung ist jedoch von einer eher unterschätzten Prävalenz auszugehen. In Deutschland kommt die AS mit einer Häufigkeit von 0,86% vor und ist damit die häufigste Erkrankung in der Gesamtgruppe der SpA (Braun *et al.*, 1998a). Männer sind dreimal häufiger betroffen als Frauen. Das mittlere Alter bei Symptombeginn liegt bei 26 Jahren, eine Erstmanifestation vor dem 16. und nach dem 45. Lebensjahr ist selten. In etwa 90% der Fälle handelt es sich um eine primäre AS, d.h. es lässt sich keine Assoziation mit einer anderen SpA-Untergruppe nachweisen. In 10% ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, eine Psoriasis oder eine vorausgegangene reaktive Arthritis diagnostizierbar.

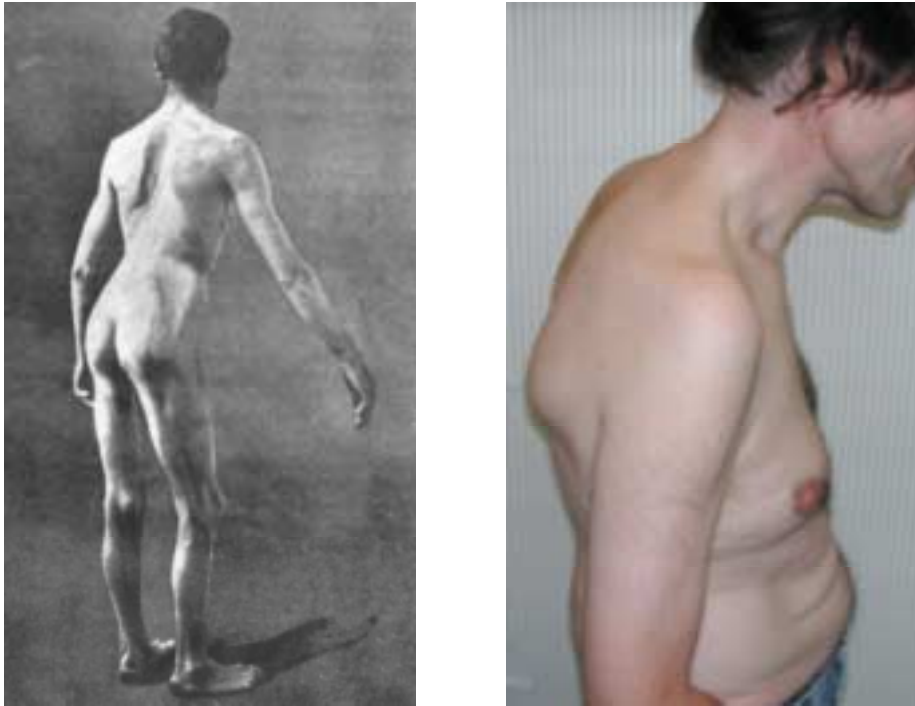
### **I.1.2. Klinische Manifestation**

Die AS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung und manifestiert sich vorwiegend am muskuloskelettalen System und, in selteneren Fällen, an extraskelettalen Organen. Sie ist charakterisiert durch das Nebeneinander von entzündlich bedingtem Schmerz und zunehmender Einsteifung an Wirbelsäule und Thorax. Die Erkrankung verläuft typischerweise in Schüben und erstreckt sich meist über mehrere Jahrzehnte.

Das typische Befallsmuster der AS ist asymmetrisch verteilt und involviert bevorzugt das Achsenskelett und die großen Gelenke der unteren Extremität. Das häufigste initiale Symptom der AS ist der durch eine Sakroiliitis ausgelöste dumpfe, tiefe Rückenschmerz, der den Betroffenen klassischerweise nachts aufwachen lässt und durch Umhergehen gelindert werden kann. Bei einem kleineren Teil der Patienten beginnt die AS mit einer akuten Monarthrit der unteren Extremität, die dem Befall des Ileosakralgelenks (ISG) dann oft vorausgeht. Insgesamt sind periphere Gelenke im Laufe der Erkrankung bei einem Drittel der Patienten betroffen. Die Wirbelsäule ist im Rahmen einer Spondylitis und Spondylodiszitis betroffen. Der Patient klagt über Rückenschmerzen, meist am thorakolumbalen Übergang, und über vom Rücken nach vorne ausstrahlende Thoraxschmerzen, die sich bei maximaler Inspiration, Niesen oder Husten verschlechtern. Eine zusätzliche Synchondritis des Sternums und eine Arthritis der Sternoclavikulargelenke kann diese Symptomatik verstärken. Meist kann eine deutliche Morgensteifigkeit erfragt werden. Eine Enthesitis kann an allen Ansätzen von Sehnen, Bändern und Gelenkkapseln auftreten, vorwiegend sind Achillessehne, Plantarfaszie und die Ansatzpunkte an Trochanter major und Crista iliaca betroffen.



Die häufigste extraskelettale Manifestation ist die Iridozyklitis, die in vielen Fällen eine gezielte Diagnostik in Richtung HLA-B27-assoziiierter SpA einleitet (Feltkamp & Ringrose, 1998). Kardiovaskuläre (fibrotisch bedingte Reizleitungsstörungen, Aortitis, Aortenklappeninsuffizienz), pulmonale (Lungenfibrose), renale (sekundäre Amyloidose) und neurologische (Cauda-equina-Syndrom, atlanto-axiale Dislokation) Beteiligungen sind selten.



**Abb. 1:** Erste dokumentierte Fotografie eines an AS erkrankten Mannes 1897 (links, aus: Strümpell, 1897) und aktuelle Aufnahme eines im Rahmen dieser Arbeit betreuten Patienten (rechts).

### I.1.3. Histopathologie

Die Pathogenese der für die AS typischen histopathologischen Befunde ist nicht eindeutig geklärt. Wahrscheinlich ist die Pathologie der RA, deren klassisches pathomorphologisches Substrat die Synovitis mit konsekutiv destruierendem Pannusgewebe ist, nicht auf die AS zu übertragen (Laloux *et al.*, 2001). Längere Zeit wurde versucht, die Enthesitis als ursächlichen Pathomechanismus für die AS zu belegen (Ball, 1971; McGonagle *et al.*, 1998; McGonagle *et al.*, 1999). Nach neueren Untersuchungen sind die histopathologischen Veränderungen der AS das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels aus Enthesitis, Synovialitis und Ossifikation. Die einzelnen Komponenten scheinen dabei an ISG, Wirbelsäule, und peripheren Gelenken in jeweils unterschiedlichem Ausmaß beteiligt zu sein (Francois *et al.*, 2001). Die terminale Ossifikation, insbesondere des ISG, ist vermutlich bedingt durch neu entstehendes subchondrales Granulationsgewebe, das in fortgeschrittenen Stadien durch fibrocartilaginäre Metaplasie zu Lamellenknochen umgebaut wird, was schließlich zur ossären

Gelenkspaltverödung führt (Bollow *et al.*, 2000; Francois *et al.*, 2000). Möglicherweise werden diese Vorgänge durch subchondrale Osteitiden getriggert (Ahlstrom *et al.*, 1990; Bollow *et al.*, 1995).

#### **I.1.4. Diagnose**

Die frühzeitige Diagnosestellung der AS stellt nach wie vor ein Problem dar. In Frühstadien der Erkrankung ist die Anamnese, v.a. die Familienanamnese und die genaue Schmerzanamnese wegweisend. Eine positive Familienanamnese erhöht das Erkrankungsrisiko für B27-positive Verwandte ersten Grades um 30% (Reveille *et al.*, 2001). Erhöhte laborchemische Entzündungszeichen und das Vorliegen von HLA-B27 können allenfalls die Differenzialdiagnosen eingrenzen. Die Bewegungsprüfung und konventionelle Röntgenbefunde sind in den ersten Jahren oft unauffällig, da in der Regel noch keine knöchernen Veränderungen vorliegen. Frühe entzündliche Läsionen sind jedoch gut durch Gadoliniumanreicherung in T<sub>1</sub>-gewichteten Kernspinaufnahmen und STIR-Sequenzen detektierbar (Braun & van der Heijde, 2002; Braun *et al.*, 2003), Enthesitiden mittels kernspintomografischer und sonografischer Bildgebung (Olivieri *et al.*, 1998; D'Agostino *et al.*, 2003). In späteren Krankheitsstadien kann die Diagnose aufgrund der fixierten Wirbelsäule oft schon inspektorisch gestellt werden. Die progrediente, aufsteigende Versteifung der Wirbelsäule führt zum typischen „Bechterew-Habitus“ mit Steilstellung der LWS, Kyphosierung der BWS und kompensatorischer Lordosierung der HWS. In diesem Stadium können anhand etablierter Funktionstests Bewegungseinschränkungen der Wirbelsäule und des Thorax objektiviert werden. Radiologisch sind Destruktions-, Sklerose- und Ankylosezeichen an Wirbelsäule und ISG erkennbar. Typisch ist das sogenannte „bunte Bild“ der Sakroiliitis, das aus dem Nebeneinander von entzündlichen und verknöchernden Vorgängen entsteht. An der Wirbelsäule sind Verkalkungen des Ligamentum longitudinale anterius und der Bandscheiben nachzuweisen, an den einzelnen Wirbelkörpern Syndesmophyten und osteoporotische Auflockerungen, im Vollbild und Endstadium eine sogenannte „Bambusstabwirbelsäule“. Für die Diagnosefindung der AS wurden Scores entwickelt, in denen anamnestische, klinische und bildgebende Befunde gewichtet werden und die v.a. eine Frühdiagnose erleichtern sollen [modifizierte New York Kriterien (van der Linden *et al.*, 1984), Diagnosekriterien der European Spondylarthopathy Study Group ESSG (Dougados *et al.*, 1991), Kriterien der Konsensuskonferenz 2002 (Braun & Sieper, 2002)].

#### **I.1.5. Therapie**

Wie alle chronischen Erkrankungen wird auch die AS im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzepts behandelt. Bisher steht keine kausale Therapie zur Verfügung. Konsequente aktive und passive physikalische Therapie, medikamentöse Therapie, psychische Führung und

gegebenenfalls operative Rekonstruktionsverfahren sind die Säulen einer symptomorientierten Behandlung.

Die verfügbare medikamentöse Behandlung ist unbefriedigend und beschränkt sich im Wesentlichen auf eine symptomatische Schmerztherapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Diese können mit Analgetika und Coanalgetika (z.B. Antidepressiva) kombiniert werden. Eine zunehmende Rolle spielen selektive Cyclooxygenase-2-Hemmer (Dougados *et al.*, 2001). Corticosteroide versagen als langfristiges Therapieprinzip; ihr Stellenwert ist vorwiegend in der intraartikulären Lokalthherapie zu sehen (Maugars *et al.*, 1992; Braun *et al.*, 1996). Bei hoher Krankheitsprogression oder peripherem Befallsmuster kann eine zeitlich limitierte systemische Gabe von Corticosteroiden versucht werden. Im Gegensatz zur RA existieren für die Therapie der AS keine etablierten Basistherapeutika (DMARDs: disease modifying antirheumatic drugs). Nur für Sulfasalazin konnte ein signifikanter Effekt auf periphere Arthritiden (Dougados *et al.*, 1995; Clegg *et al.*, 1996) und okuläre Komplikationen (Benitez-Del-Castillo *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Ein positiver Effekt von Methotrexat (MTX) kann angenommen werden (Biasi *et al.*, 2000; Sampaio-Barros *et al.*, 2000; Gonzalez-Lopez *et al.*, 2002). Ob Sulfasalazin und MTX die Progredienz, insbesondere der Wirbelsäulenbeteiligung, aufhalten und damit die Langzeitprognose verbessern, ist bisher nicht untersucht worden (Maksymowych *et al.*, 2002). Offen ist darüber hinaus, wie Sulfasalazin in die pathogenetischen Prozesse der AS eingreift. Vermutet werden u.a. Einflüsse auf eine assoziierte subklinische Darmentzündung (Mielants *et al.*, 1996) und eine Hemmung der TNF-Expression in Makrophagen (Rodenburg *et al.*, 2000).

Neuere therapeutische Optionen deuten sich für Thalidomid (Huang *et al.*, 2002), Bisphosphonate (Maksymowych *et al.*, 2001) und TNF-Hemmstoffe an, die sich in der klinischen Erprobung befinden. Eine Neuauflage erfährt derzeit Radiumchlorid ( $^{224}\text{Ra}$ ) (Braun *et al.*, 2001), das bereits in den 50iger Jahren als ThoriumX in der Therapie der AS eingesetzt, dann aber vom Markt genommen wurde. Im Oktober 2000 wurde es erneut durch das Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) als  $^{224}\text{SpondylAT}$  zugelassen (N.N., 2001).

### **I.1.6. Prognose**

Charakteristisch für die AS ist die Tatsache, dass die Erkrankung in jedem Stadium spontan arretieren kann, so dass Krankheitsverlauf und Ausmaß der Bewegungseinschränkung sehr variabel sind (Little, 1988). Die Erkrankungsschwere scheint genetisch determiniert zu sein (Hamersma *et al.*, 2001). Männer sind häufig schwerer betroffen als Frauen (Feldtkeller & Braun, 2000). Langzeitstudien zeigen, dass die AS keinen Einfluss auf die Gesamtmortalität nimmt (Carbone *et al.*, 1992). Dennoch ist die AS innerhalb der SpA die am schwersten verlaufende Erkrankung. Aus neueren Untersuchungen geht hervor, dass die mit AS verbundenen gesundheitlichen Einschränkungen bisher

unterschätzt wurden. Patienten mit AS fallen im Vergleich zur gesunden Bevölkerung signifikant häufiger am Arbeitsplatz aus (Boonen *et al.*, 2001) und verursachen beträchtliche sozioökonomische Kosten (Ward, 2002). Nach 20 Erkrankungsjahren leiden über 80% der Patienten an persistierenden NSAR-pflichtigen Schmerzen (Gran & Skomsvoll, 1997). Für schwere Formen der AS konnte eine der RA vergleichbare Invalidität nachgewiesen werden (Zink *et al.*, 2000; Chorus *et al.* 2003).

## **I. 2. HLA-B27**

HLA-B27-Allele sind in fast allen Populationen der Erde nachweisbar. Immer wieder wird daher diskutiert, ob diese weltweite Prävalenz mit einem vermeintlichen Selektionsvorteil für HLA-B27-Träger zusammenhängt. Möglicherweise spielt HLA-B27 innerhalb der MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC = Major Histocompatibility Complex) eine herausragende Rolle bei der Generierung einer virusspezifischen Immunantwort. So wurde beispielsweise beobachtet, dass bei HLA-B27-positiven HIV-Infizierten die Krankheitsprogression zu AIDS-definierenden Krankheiten und die CD4<sup>+</sup>-Depletion langsamer verläuft (Kaslow *et al.*, 1996; Goulder *et al.*, 2001).

### **I.2.1. HLA-B27-Subtypen**

Inzwischen sind 26 HLA-B27-Allele und 24 Subtypen identifiziert (Khan & Ball, 2002). Die HLA-B27-Subtypen sind entsprechend ihres Sequenzierungszeitpunktes chronologisch von B\*2701 bis B\*2725 durchnummeriert. Sie sind im Laufe der Evolution direkt oder indirekt aus B\*2705 entstanden, größtenteils durch Aminosäureveränderungen in den Exons 2 und 3, die für die Antigenbindungsgrube kodieren (Ball & Khan, 2001; Reveille *et al.*, 2001). Daher unterscheiden sich die Subtypen teilweise in ihren Peptidbindungseigenschaften und damit in ihrem Präsentationsverhalten, was die unterschiedlich starke oder fehlende Krankheitsassoziation zu AS mitbedingen könnte (Ramos *et al.*, 2002; vgl. auch 1.2.2.).

Die weltweite HLA-B27-Frequenz ist nicht einheitlich. Es gibt große Unterschiede sowohl in der Prävalenz von HLA-B27, als auch in der Verteilung der Subtypen. Es herrscht ein deutliches Nord-Süd-Gefälle im Sinne einer abnehmenden Prävalenz. Am häufigsten ist HLA-B27 in den circumpolaren Regionen und im Hochland von Papua-Neuguinea zu finden, während es bei den Eingeborenenstämmen Südamerikas, Süd- und Zentralafrikas (mit Ausnahme der Pygmäen) und Australiens praktisch abwesend ist. Die Prävalenz in der kaukasischen Bevölkerung liegt bei 6.4 - 6,7% (Braun *et al.*, 1998a).

B\*2705 ist der weitverbreitetste Subtyp und in annähernd allen Populationen nachweisbar, dies hängt wohl mit seiner Rolle als Ur-Subtyp zusammen. Bei den HLA-B27-positiven Kaukasiern ist B\*2705

mit 90 - 96% der dominierende Subtyp. Die anderen Allele sind teilweise sehr selten oder vorherrschend in umschriebenen Bevölkerungsgruppen.

Nicht alle HLA-B27-Allele sind gleichermaßen assoziiert mit AS. Unter den schon länger bekannten Subtypen B\*2701 - 10 zeigen nur die Allele B\*2702, 04, 05, 07, 08 eine klare Krankheitsassoziation. Dabei variiert das Erkrankungsrisiko und Erkrankungsspektrum beträchtlich. Vermutlich spielen neben der Art des Subtyps auch der ethnische und geografische Hintergrund der betreffenden Person eine Rolle. So scheint in Westafrika B\*2705 bei einer im Vergleich zu Europa höheren Prävalenz (7,8%) nicht krankheitsassoziiert zu sein, da dort bisher nur gesunde Träger dieses Allels gefunden wurden (Brown *et al.*, 1997). Bei den erst zwischen 1998 und 2002 entdeckten Subtypen B\*2710 - 24 ist der Bezug zur AS und teilweise auch die Prävalenz noch nicht klar (vgl. Tab. 1).

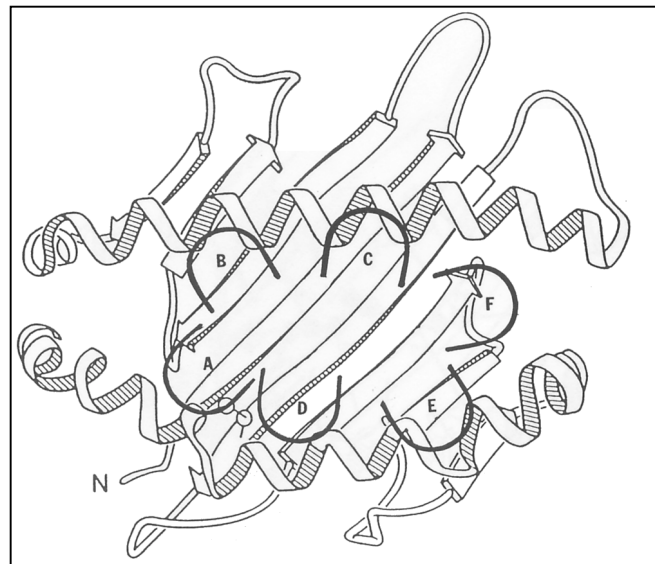
HLA-B27- Subtyp	Geografische Prävalenz	AS-Assoziation
B*2701	sehr selten, nur bei 2 kaukasischen Individuen nachgewiesen	fraglich
B*2702	Kaukasoide, semitische Gruppen	ja
B*2703	Westafrika	wahrscheinlich
B*2704	China, Japan, Thailand	ja
B*2705	praktisch in allen Populationen mit Ausnahme der westafrikanischen Bevölkerung im Senegal und in Gambia	ja
B*2706	China, Thailand	nein
B*2707	selten, Indien, China, Thailand	ja
B*2708	Westeuropa, Azoren	ja
B*2709	Italien, Sardinien	nein
B*2710	sehr selten, weiße nordamerikanische Bevölkerung	fraglich
B*2711	Japan	unklar
B*2712	Spanien, Großbritannien	unklar
B*2713 - B*2725	unklar	unklar

**Tab. 1:** Prävalenz und AS-Assoziation der HLA-B27-Subtypen. Da B\*2706 und B\*2722 identisch sind, existieren bei 26 verschiedenen Allelen nur 25 Subtypen.

### I.2.2. HLA-B27 und Spondylitis ankylosans

Obwohl die Assoziation der AS mit HLA-B27 seit 30 Jahren bekannt ist (Schlosstein *et al.*, 1973; Schattenkirchner *et al.*, 1974), ist es bisher nicht gelungen, die pathogenetischen Mechanismen bei der Entstehung der AS aufzuhellen. Nachdem Anfang der 90iger Jahre die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des HLA-B27-Moleküls gelang (Gorga *et al.*, 1992; Madden *et al.*, 1992) (vgl. Abb. 2), wurden zahlreiche Hypothesen entwickelt, die auf den Antigenbindungseigenschaften des HLA-B27-Moleküls aufbauten. Es wurde postuliert, dass die von HLA-B27 gebundenen Peptide oder HLA-B27 selbst Strukturähnlichkeiten mit bakteriellen Epitopen aufweisen könnten, wodurch Autoimmunphänomene getriggert würden (*Arthritogenic peptide theory*: Benjamin & Parham, 1990; Benjamin & Parham, 1992; Parham, 1996b. *Promiscuous theory*: Davenport, 1995; zusammengefasst in: Lopez-Larrea *et al.*, 1998). Ein ungepaartes, potentiell reaktives Cystein innerhalb der HLA-B27-Antigenbindungsgrube könnte zudem unter bestimmten Umständen, etwa im Falle einer bakteriellen

Infektion, die Peptidbindungseigenschaften von HLA-B27 verändern oder dessen Antigenität bewirken (*Reactive thiol theory*: Whelan & Archer, 1993). Keine dieser Hypothesen konnte bisher jedoch belegt werden (Ringrose, 1999). Neuere Ansätze implizieren pathogenetische Effekte des HLA-B27-Moleküls jenseits von dessen Antigenstruktur und Peptidbindungseigenschaften. Es wird diskutiert, ob HLA-B27 das intrazelluläre Überleben invasiver Bakterien begünstigen (Sieper & Braun, 1995; Laitio *et al.*, 1997) oder in prätranskriptionelle (Ikawa *et al.*, 1998) bzw. posttranskriptionelle (Kirveskari *et al.*, 1999) Signalkaskaden eingreifen könnte. Ferner wird eine fehlerhafte Proteinfaltung bei der Prozessierung des HLA-B27-Moleküls angeschuldigt, die Generierung trimolekularer HLA-B27-Komplexe zu behindern (Mear *et al.*, 1999). In diesen Erklärungsmodellen würde dem sogenannten unspezifischen oder angeborenen Immunsystem eine zentrale Rolle bei der Entstehung der AS zukommen (Colbert, 2000; Pacheco-Tena *et al.*, 2002).



**Abb. 2:** HLA-B27-Modell mit Aufsicht auf die Antigenbindungsgrube (aus: Kellner & Yu, 1992)

Die Antigenbindungsgrube eines MHC-Klasse-I-Moleküls<sup>1</sup> bildet verschiedene Bindungstaschen aus, sogenannte Pockets, mit denen die jeweiligen Aminosäureketten des Peptids interagieren. Typischerweise bindet ein MHC-Klasse-I-Molekül dabei ein Nonapeptid. Einige dieser Pockets sind besonders restriktiv und akzeptieren nur eine bestimmte (oder manchmal auch zwei ähnliche) Aminosäuren. Sie sind verantwortlich für das Zustandekommen sogenannter Ankermotive. Darunter versteht man eine oder auch zwei Positionen mit praktisch invarianten Aminosäuren, die das Peptid enthalten muss, um vom MHC-Molekül gebunden werden zu können (Rammensee *et al.*, 1993).

Die Antigenbindungsgrube des HLA-B27-Moleküls bildet sechs Pockets aus (A bis F, vgl. Abb. 2). Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Subtypen, so fallen Unterschiede in bis zu sieben Positionen auf, die vorwiegend innerhalb der Antigenbindungsgrube liegen. Da von diesen Aminosäureveränderungen mit Ausnahme der B-Pocket, die bei allen Subtypen nahezu identisch ist, alle Bindungstaschen betroffen sind, wird die Peptidselektion wesentlich durch die B-Pocket bestimmt (Reveille *et al.*, 2001).

Die Assoziation von HLA-B27 und AS ist epidemiologisch durch Familien- und Zwillingsstudien belegt (Rubin *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1998; Said-Nahal *et al.*, 2000). Genetische Faktoren scheinen

<sup>1</sup> Es wird größtenteils die MHC-Nomenklatur verwendet. HLA-B27 wird als in der Literatur übliche Bezeichnung beibehalten.

bei der Entwicklung und Progredienz der AS wesentlich größeren Einfluss zu haben als Umweltfaktoren (Doran *et al.*, 2003). Obwohl HLA-B27 ein dominierender Prädispositionsfaktor zu sein scheint (Martinez-Borra *et al.*, 2000), ist offenbar die genetische Disposition dadurch nicht ausreichend erklärt, denn der Großteil der HLA-B27-positiven Individuen bleibt gesund. Nur 1 - 2% aller HLA-B27-Träger entwickeln im Laufe ihres Lebens eine zum Formenkreis der SpA gehörende Erkrankung (Calin & Taurog, 1998). Wie bereits erwähnt, ist die Assoziation zwischen HLA-B27 und AS in genetisch-ethnisch verschiedenen Populationen unterschiedlich hoch (vgl. I.2.1., Brown *et al.*, 1997). Auch im Tiermodell hängt die Krankheitsanfälligkeit entscheidend vom genetischen Hintergrund der jeweiligen Tiere ab (Hammer *et al.*, 1990; Taurog *et al.*, 1994). Zudem gibt es Fälle HLA-B27-negativer AS. Vor der Einführung PCR für die Bestimmung des HLA-B27-Status wurde die niedrige diagnostische Spezifität der routinemäßig angewandten Durchflusszytometrie als mögliche Erklärung für diesen Befund diskutiert (Kirveskari *et al.*, 1997). DNA-Typisierungen, bei denen falsch negative Ergebnisse praktisch ausgeschlossen sind, belegen hingegen, dass sich das Vollbild einer AS durchaus in Abwesenheit von HLA-B27 entwickeln kann (Gonzalez *et al.*, 2001). Unter der Vorstellung eines oligo- oder polygenetischen Pathomechanismus wird heute der Einfluss zusätzlicher Gene sowohl auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit als auch auf die Symptomkonstellation angenommen. Der Anteil von HLA-B27 am genetischen Gesamtrisiko liegt zwischen 16 und 50% (Reveille *et al.*, 2001).

### **I.3. TUMOR NEKROSE FAKTOR (ALPHA)<sup>2</sup>**

Tumor Nekrose Faktor (TNF) wird der TNF-Familie zugerechnet, die mit 20 verschiedenen Zytokinen eine der größten Zytokinfamilie darstellt. Die Bezeichnung *Tumor Nekrose Faktor* erklärt sich aus dessen Erstbeschreibung in den 70iger Jahren nach Versuchen an LPS-behandelten Mäusen. Aus dem Serum dieser Tiere konnte eine Substanz isoliert werden, die bei bestimmten Tumoren hämorrhagische Nekrosen induzierte (Carswell *et al.*, 1975). Unabhängig davon wurde später dasselbe Protein als sogenanntes *Kachektin* beschrieben, das als zirkulierender Mediator mit dem wasting syndrom bestimmter chronischer Erkrankungen assoziiert war (Beutler *et al.*, 1985). TNF ist ein pleiotropes Zytokin mit komplexen Wirkungen auf Immunität, Blutgerinnung, Endothelfunktion, Lipid- und Insulinstoffwechsel. Neuere Befunde lassen auf eine Schlüsselrolle dieses Zytokins bei der Pathogenese bestimmter inflammatorischer Erkrankungen schließen, was zur Entwicklung eines neuen Therapieansatzes geführt hat: der medikamentösen TNF-Blockade.

---

<sup>2</sup> Nachdem TNF $\beta$  in Lymphotoxin  $\alpha$  umbenannt wurde, wird TNF $\alpha$  in der Literatur zunehmend durch TNF ersetzt. Die vorliegende Arbeit passt sich dieser Nomenklatur an.

### I.3.1. TNF als Schlüsselzytokin der lokalen Immunantwort

TNF ist der wichtigste Vermittler der antibakteriellen Immunantwort, insbesondere gegenüber gramnegativen Bakterien. Die Hauptproduzenten dieses Zytokins sind LPS-stimulierte Makrophagen (Vassalli, 1992). Aufgrund seiner komplexen Wirkungen spielt TNF sowohl innerhalb der angeborenen als auch der spezifischen Immunität eine zentrale Rolle und stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen akuter Entzündungsreaktion und spezifischer Immunantwort dar. Die durch TNF vermittelten Wirkungen sind nicht uniform und nur im Zusammenhang des zytokinen Netzwerks zu sehen. Sie sind abhängig von Effektorzelle, Expositionsdauer, freigesetzter Menge, zellulärer und extrazellulärer Umgebung, um nur einige Aspekte zu nennen (Cope *et al.*, 1997; Vaday *et al.*, 2001; O'Shea *et al.*, 2002).

In der lokalen Immunantwort spielt TNF eine - vielleicht sogar *die* - zentrale Rolle. Über autokrine und parakrine Mechanismen induziert TNF komplexe, für die Entzündungsreaktion entscheidende Effekte, wie z.B. Freisetzung von Chemokinen, Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Mediatoren (z.B. Interleukine, GM-CSF, Prostaglandine, Matrixmetalloproteinasen) (Alvaro-Gracia *et al.*, 1990; Tracey & Cerami, 1993), vermehrte Expression von MHC-Molekülen (Hallermalm *et al.*, 2001) und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM, E-Selectin) (Xia *et al.*, 1998; Hubbard & Rothlein, 2000) und fördert so die Leukozytenrekrutierung in Entzündungsherden. Als Comitogen stimuliert es die Lymphozytendifferenzierung (Brenner, 1988; Pape *et al.*, 1997) und optimiert die Interaktion zwischen Lymphozyten und MHC-Epitopen. Indem es sowohl proapoptische als auch antiapoptische Signale vermittelt, kommt TNF darüber hinaus entscheidende Bedeutung bei der Zellkontrolle zu (Beg & Baltimore, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996; Wallach *et al.*, 1999; Baud & Karin, 2001; Leong & Karsan, 2000).

TNF existiert sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form, beide sind biologisch aktiv (Decoster *et al.*, 1995). Es wird zunächst als nicht glykosyliertes homotrimeres Transmembranprotein synthetisiert. Die lösliche homotrimere Form entsteht sekundär durch proteolytische Abspaltung der Untereinheiten von der Zellmembran durch eine Metalloprotease, das sogenannte TNF converting enzyme (TACE) (Black *et al.*, 1997). Die jeweiligen Zytokinwirkungen werden über spezifische membranständige Rezeptoren vermittelt. Bisher konnten zwei verschiedene TNF-Rezeptoren (TNF-R) identifiziert werden: TNF-RI [CD120a oder p60 (Mensch), p55 (Maus); Loetscher *et al.*, 1990] und TNF-RII [CD120b oder p80 (Mensch), p75 (Maus); Schall *et al.*, 1990]. TNF-RI wird bis auf wenige Ausnahmen auf fast allen Zellen exprimiert, TNF-RII vorwiegend auf Zellen myeloiden Ursprungs, besonders ausgeprägt auf stimulierten B- und T-Lymphozyten. Die meisten biologischen Effekte werden über TNF-RI vermittelt, TNF-RII spielt v.a. bei der Entwicklung und Kontrolle von T-Lymphozyten eine Rolle (Peschon *et al.*, 1998). Aktivierte Zellen zeigen eine vermehrte Expression von TNF-R, vorwiegend vermittelt durch INF $\gamma$  (Aggarwal *et al.*, 1985). TNF induziert auf der Zelloberfläche die Trimerisation des TNF-R, wodurch verschiedene Signalkaskaden angestoßen



werden. Viele TNF-Effekte werden über vermehrte Transkriptionsraten bestimmter Zielgene vermittelt, größtenteils durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1 (Barnes & Karin, 1997; Ghosh & Karin, 2002; MacEwan, 2002).

### **I.3.2. TNF-blockierende Substanzen in der klinischen Anwendung**

Die Realisierung einer therapeutischen TNF-Blockade ist auf verschiedenen Ebenen denkbar. Mögliche pharmakologische Angriffspunkte sind Induktion, Expression und Prozessierung von TNF, oder die Interaktion zwischen TNF und TNF-R. Interessanterweise konnte inzwischen für seit langem in der Rheumatologie angewandte Medikamente, wie Glucocorticoide, Acetylsalicylsäure und Sulfasalazin, eine NF $\kappa$ B-inhibitorische Wirkung gezeigt werden (Lee & Burckart, 1998), so dass angenommen werden kann, dass mit diesen Substanzen auch TNF-vermittelte Effekte gehemmt werden. Auch Thalidomid (Contergan®), das in Zukunft eine interessante Therapieoption in der Rheumatologie darstellen könnte, blockiert die TNF-Translation (Calabrese & Fleischer, 2000; Sharma *et al.*, 2002). Eine Neutralisierung sowohl des löslichen als auch des membrangebundenen TNF ist mit anti-TNF-AK oder löslichen TNF-Rezeptorfusionsproteinen möglich. Für beide Angriffspunkte wurden inzwischen TNF-Hemmstoffe entwickelt. Die Wirkung beider Substanzen beruht auf einer kompetitiven Bindung des TNF-Moleküls, wodurch dessen Interaktion mit dem spezifischen TNF-R verhindert wird. Da anti-TNF-AK und TNF-R unterschiedliche Bindungsstellen am TNF-Molekül benutzen, wird vermutet, dass anti-TNF-AK darüber hinaus eine bereits bestehende Bindung von TNF an den TNF-R stören und evtl. lösen können.

Anti-TNF-AK existieren als chimäre AK (Infliximab oder cA2), humanisierte AK (CDP571) oder voll humane AK (Adalimumab oder D2E7). Infliximab ist in Deutschland als Remicade® derzeit für die Indikationen RA und Morbus Crohn zugelassen. D2E7 steht kurz vor seiner Zulassung. TNF-Rezeptorfusionsproteine sind rekombinante Fusionsproteine aus zwei humanen TNF-R, die an ein Fc-Fragment des IgG1 gebunden sind und eine der drei identischen Bindungsstellen des TNF-Moleküls besetzen. Für beide TNF-R-Typen wurden Fusionsproteine entwickelt (sTNF-R(p55)-IgG1 oder Ro45-2081 oder Lenercept; sTNF-R(p75)-IgG1 oder Etanercept). Lenercept hat sich trotz klinischer Wirksamkeit nicht durchgesetzt, Etanercept ist in Deutschland für die Indikationen RA, Juvenile RA und Arthritis psoriatica als Enbrel® zugelassen.

Die Halbwertszeit chimärer bzw. rekombinanter AK beträgt nach Einmalgabe etwa 9 – 10 Tage, die ermittelten Plasmaspiegel lassen dabei auf eine Verteilung in zwei Kompartimente schließen (Maini *et al.*, 1998; Van de Putte *et al.*, 1998). Umfangreiche Analysen unter steady state Bedingungen stehen bisher nicht zur Verfügung. Die für den therapeutischen Effekt verantwortlichen Mechanismen der TNF-Blockade sind noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der chimären AK auf der einen Seite und beschwerdefreien Infusionsintervallen von bis zu 9 Wochen auf

der anderen Seite (Wittwer *et al.*, 2003; Boeger *et al.*, 2001) müssen neben einer Zytokinneutralisation (Charles *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2002a) noch andere Wirkmechanismen angenommen werden. Darüber hinaus ist die im Zusammenhang mit der RA beobachtete Hemmung der radiologischen Progression unter Fusionsproteinen (Genovese *et al.*, 2002), chimären (Jones *et al.*, 2003) und humanen AK (den Broeder *et al.*, 2002) nicht ausschließlich durch direkte Effekte einer TNF-Neutralisation erklärbar. Ausgehend von den in I.3.1. dargelegten TNF-Wirkungen ist hierbei vorwiegend an TNF-vermittelte Veränderungen auf zellulärer Ebene zu denken.

#### **I.4. ENTWICKLUNG DER FRAGESTELLUNG**

In der vorangegangenen Einleitung wurde die AS charakterisiert und deren Assoziation mit HLA-B27 herausgearbeitet. Darüber hinaus wurde die immunologische Bedeutung TNF-vermittelter Effekte dargelegt, worauf die klinische Anwendung TNF-inhibitorischer Substanzen beruht.

In der vorliegenden Arbeit werden die *Effekte einer Infliximab-Therapie bei Patienten mit aktiver AS* untersucht. Die Ausführungen gliedern sich hierzu in einen klinischen und einen experimentellen Teil.

Im *klinischen Teil* wird die Therapiewirksamkeit und –sicherheit von Infliximab beurteilt.

Dies geschieht anhand folgender vier Fragestellungen:

1. Einfluss einer Infliximab-Therapie auf die klinische Krankheitsaktivität
2. Einfluss einer Infliximab-Therapie auf den Verlauf der laborchemischen Entzündungsparameter
3. Einfluss einer Infliximab-Therapie auf den kernspintomografischen Befund
4. Sicherheit und Verträglichkeit einer Infliximab-Therapie

Im *experimentellen Teil* wird der Einfluss einer Infliximab-Therapie auf die Oberflächenexpression von MHC-Molekülen, insbesondere von HLA-B27-Molekülen, analysiert. Es wird untersucht, ob der therapeutische Erfolg unter Infliximab mit einer Veränderung der MHC-Expressionsstärke auf Lymphozyten assoziiert ist.

Hintergrund dieser Fragestellung sind Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen Krankheitsmanifestation bzw. –aktivität und HLA-B27-Expressionsstärke vermuten lassen. Sowohl die verminderte, als auch die erhöhte Oberflächenexpression von HLA-B27 werden als Pathogenitätsfaktoren diskutiert. So wurde einerseits im akuten Stadium der SpA eine erniedrigte bzw. fehlende HLA-B27-Oberflächenexpression beschrieben, worauf hin die Möglichkeit einer Herunterregulation oder Maskierung von HLA-B27-Molekülen postuliert wurde (Amor *et al.*, 1978; Neumüller *et al.*, 1993; Wuorela *et al.*, 1997; Kirveskari *et al.*, 1997; Kirveskari *et al.*, 1999).

Im Widerspruch hierzu konnte bei AS-Patienten eine im Vergleich zu gesunden HLA-B27-Trägern signifikant höhere HLA-B27-Expression gemessen werden, was zu der Hypothese führte, dass die AS mit einer erhöhten HLA-B27-Expression assoziiert sein könnte (Cauli *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse liegen auch aus Tiermodellen vor, wonach eine positive Korrelation zwischen der Menge der exprimierten HLA-B27-Moleküle und der Krankheitsanfälligkeit zu bestehen scheint (Taurog *et al.*, 1993).

## **II. MATERIAL UND METHODEN**

Von Mitte 2000 bis Ende 2002 wurde bei AS-Patienten erstmals eine so genannte Investigator Initiated Study mit Infliximab durchgeführt (TNF-AS-2-Studie; Braun *et al.*, 2002). Es handelte sich dabei um eine multizentrische, randomisierte, doppelblinde, placebo-kontrollierte, single-dummy Studie, die sich in zwei aufeinanderfolgende Phasen gliederte. In 8 verschiedenen deutschen Zentren nahmen insgesamt 70 Patienten teil. In der verblindeten Phase a (Woche 0 – 14) wurde im Vergleich zwischen Placebo- und Verumgruppe die therapeutische Effektivität von Infliximab bei der AS beurteilt. In der offenen Phase b (Woche 14 – 114) erhielten unter Verzicht auf die Placebogruppe alle Patienten bis zum Studienende die Verummedikation, um deren Langzeiteffekte auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen.

Patientenrekrutierung und Therapieprotokoll der vorliegenden Arbeit orientieren sich am Studiendesign dieser TNF-AS-2-Studie.

### **II.1. EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN**

Es wurden Patienten im Alter zwischen 18 und 60 Jahren mit klinisch aktiver AS eingeschlossen. Hierzu mussten die New-York-Kriterien erfüllt sein (radiologisch nachweisbare Sacroiliitis  $\geq$  Grad 2, (van der Linden *et al.*, 1984) und ein über die letzten 3 Monate bestehender BASDAI- (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) und Schmerzscore  $\geq 4$  vorliegen. Sowohl weibliche als auch männliche Studienteilnehmer im fortpflanzungsfähigen Alter waren verpflichtet, einen verlässlichen Konzeptionsschutz zu verwenden.

Als Ausschlusskriterien galten Schwangerschaft, bzw. geplante Schwangerschaft bis zu einem halben Jahr nach Beendigung der Studie, Stillperiode, frühere Exposition gegenüber murinen oder chimären AK, chronische bzw. durchgemachte ernste oder opportunistische Infektionen, aktive TBC innerhalb der letzten 3 Jahre, HIV- oder AIDS-Infektion, bekannte lymphoproliferative Erkrankungen, durchgemachte maligne Erkrankungen, klinisch relevante Auffälligkeiten bei der klinischen Untersuchung, Drogen- oder Alkoholabusus, Teilnahme an anderen Medikamentenstudien bis zu 90 Tagen vor Studieneinschluss. Ausschlusskriterien im Hinblick auf Laborparameter waren: Hämoglobin  $< 8,5$  mg/dl, Leukozyten  $< 3,5 \times 10^9/l$ , Thrombozyten  $< 100 \times 10^9/l$ , Kreatinin  $> 1,5$  mg/dl, Leberenzyme  $> 1,5$ fach über Normalwert, alkalische Phosphatase  $> 2$ fach über Normalwert.

Eine Therapie mit Immunsuppressiva, DMARDs oder Glucocorticoiden musste 4 Wochen vor Studienbeginn für den gesamten Studienzeitraum abgesetzt werden. Die Einnahme von NSAR war erlaubt, in Studienphase a durfte deren Eingangsdosierung nicht erhöht werden, während sie in Phase b dem Bedarf angepasst werden konnte.

## **II.2. PATIENTEN**

Unter Berücksichtigung der zugrunde gelegten Kriterien konnten nach einer Rekrutierungsphase von 6 Monaten 10 Patienten eingeschlossen werden. Von allen Patienten liegt eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

## **II.3. ZIELKRITERIEN**

Hauptzielkriterium in Phase a war die Verbesserung des BASDAI in Woche 12 (Kurzzeitwirksamkeit). Patienten mit einer 50%igen Verbesserung galten als Responder, Studienteilnehmer, bei denen eine Erhöhung der NSAR-Dosierung notwendig wurde oder solche, die aus der Studie ausschieden, wurden als Nonresponder eingestuft.

Nebenzielkriterien waren die Verbesserung des BASFI (Bath Ankylosing Functional Index) und die Erniedrigung des CRP-Wertes.

Hauptzielkriterium in Phase b war die 50%ige Verbesserung des BASDAI in Woche 54 (Langzeitwirksamkeit).

Nebenzielkriterien waren die anhaltende Verbesserung des BASFI und des Schmerzscores, die konstante Erniedrigung des CRP-Wertes und die sichere Anwendbarkeit der Studienmedikation.

## **II.4. VERLAUFSPARAMETER**

Zur Beurteilung der Fragestellungen 1. bis 4. (vgl. I.4.) wurden verschiedene Verlaufsparemeter herangezogen (Calin *et al.*, 1999c).

Die *Krankheitsaktivität* wurde einerseits unter Zuhilfenahme visueller Analogskalen, andererseits durch Messung der funktionellen Bewegungseinschränkung beurteilt. Die Einschätzung anhand der Analogskalen erfolgte sowohl durch den Patienten (BASDAI, BASFI, Schmerzintensität, globales Patientenurteil), als auch durch den Arzt (globales Arzturneil, vgl. Anhang VIII.1.). Der BASDAI umfasst sechs Parameter (Müdigkeit, Schmerzen, Berührungs- oder Druckempfindlichkeit und Morgensteifigkeit), die charakteristische Aktivitätsindices für die AS darstellen (Calin *et al.*, 1999b). Der BASFI erfasst die subjektive funktionelle Einschränkung bei alltäglichen Verrichtungen (Calin *et al.*, 1994).

Zur objektiven Erfassung der funktionellen Bewegungseinschränkungen diente der BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index), der sich aus den maximal erreichbaren Werten bei Tragus-Wand-Abstand, lumbaler Flexion, lateraler Flexion, Intermalleolarabstand und cervicaler Rotation zusammensetzt (Jenkinson *et al.*, 1994; vgl. Anhang VIII.2.).

Als Indikatoren für die Therapiewirksamkeit wurden ferner herangezogen: Höhe des NSAR- und Schmerzmittelverbrauchs, Beeinflussung bestehender Arthritiden, Arthralgien und Enthesitiden, sowie die Manifestation von Uveitiden.

Die Bestimmung der *laborchemischen Entzündungsparameter* (CRP, BKS) erfolgte vor jeder Infusionsgabe.

Vor Therapiebeginn wurden konventionelle Röntgenaufnahmen des Thorax, der LWS, der HWS und beider ISG angefertigt, um die nach den New York Kriterien geforderten radiologischen Scores errechnen zu können (BASRI: Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index; Calin *et al.*, 1999a).

Der Einfluss der Therapie auf den *kernspintomografischen Befund* wurde durch den Vergleich von drei im Studienverlauf angefertigten Aufnahmen untersucht. Diese wurden nativ und nach Kontrastmittelgabe (Gadoliniumdiethylentriaminpentaessigsäure) in STIR- und T1-gewichteter Sequenz angefertigt (Braun *et al.*, 1994; Braun *et al.*, 1998b).

Um Aussagen hinsichtlich der *Therapiesicherheit* treffen zu können, wurden die Patienten bei jeder Visite anamnestiziert und klinisch untersucht. Unter Berücksichtigung der zu erwartenden Nebenwirkungen wurden vor jeder Infusionsgabe neben hepatischen und renalen Funktionsparametern antinukleäre Antikörper (ANA) bestimmt. Die ausgewählten Laborparameter sind Tab. 2 zu entnehmen. Aufgrund des Risikos einer Tuberkuloseaktivierung unter Infliximab (Keane *et al.*, 2000) wurde vor Studienbeginn bei jedem Patienten ein Tuberkulintest durchgeführt (intradermale Injektion einer Tuberkulineinheit, Tuberkulin GT 10 Behring, Chiron Behring GmbH & Co, Marburg).

## **II.5. STUDIENMEDIKATION**

Als Studienmedikament wurde der chimäre monoklonale Anti-TNF-AK cA2 (Infliximab = Remicade<sup>®</sup>, Firma Centocor, Malvern, PA, U.S., Knight *et al.*, 1993) eingesetzt. Die Applikation erfolgte intravenös in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht. Hierzu wurde die pulverisierte Form des Medikaments in destilliertem Wasser vollständig aufgelöst und über einen Filter (i.v. 3F SET-P, Infusionsfilter 1,2 µm, Firma Codan) als zweistündige Kurzinfusion in isotoner Natrium-Chlorid-Lösung verabreicht. Während der Infusionszeit und der zweistündigen Nachbeobachtungsphase wurden die Vitalparameter halbstündlich kontrolliert.

Phase a						Phase b									
Visite	S	A1	A2	A3	A5	B1	B2	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	
Woche	≤ 2 Wochen vor A1	0	2	6	12	14	18	24	30	36	42	48	54	60	
<b>Screening</b>															
Anamnese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
körperliche Untersuchung	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Röntgen WS/ISG	x														
MRT WS/ISG	x					x								x	
Röntgen Thorax	x														
<b>Infliximab [X] oder Placebo [I]</b>		X/ I	X/ I	X/ I	X	I/ X	X	X	X	X	X	X	X/-	X/-	
<b>Scores</b>															
BASDAI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
BASFI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
globales Arzturteil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
globales Pat.urteil	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Schmerzscore	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
BASMI	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
<b>Labor</b>															
CRP/BSG	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
ANA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Kreatinin	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
TA/GGT/AP/Gesamtbili	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Elektrolyte	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
kleines Blutbild	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Differentialblutbild	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
U-Status	x														
Schwangerschaftstest	x														
HLA-B27	x														
Tuberkulin-Test	x														

**Tab. 2:** Untersuchungs- und Therapieprotokoll. In Woche 54 und 60 Auslassversuch (-) bei 3 Patienten.

## **II.6. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN**

### **II.6.1. Prinzip der Durchflusszytometrie (Schmitz, 1994; Jaroszeski, 1998)**

In der Durchflusszytometrie werden Streu- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Zellen analysiert. Hierzu werden die Zellen zu einem Analysepunkt geleitet, an dem sie von einem Laserlichtstrahl beleuchtet werden. Dabei werden die Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle quantifiziert, so dass sich aus der Summe der aufeinanderfolgenden Einzelmessungen ein Analyseergebnis ergibt. Aufgrund ihrer charakteristischen physikalischen Eigenschaften (Zellgröße, Zellform, Zelloberfläche, Granularität) streut eine Zelle den sie treffenden Lichtstrahl mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich ( $0 - 10^\circ$ ; Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter FSC), ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts ( $90^\circ$ ; Seitwärtsstreulicht, Side Scatter SSC). Mittels beider Lichtstreuparameter lassen sich in Punktwolken (sog. dot plots) die wichtigsten Leukozytengruppen (Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten) unterscheiden. Eine zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit ist durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen möglich. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich. Durch Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben, beim Rücksprung auf das Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon, Fluoreszenz ist die Bezeichnung dieses Strahlungsübergangs. Werden Fluoreszenzfarbstoffe an AK konjugiert, die an spezifische Oberflächenmerkmale der Zellen binden, ist durch die emittierte Fluoreszenz die selektive Identifizierung bestimmter Zellen möglich.

Die Anzahl der gebunden spezifischen AK ist im idealen Mengenverhältnis proportional zur Anzahl der exprimierten Antigene. Aus der Kombination von Streulichtparametern und Fluoreszenzsignalen ist dadurch neben der Identifizierung von Zellen auch eine semiquantitative Bestimmung der Oberflächenexpression antikörpergebundener Antigene möglich. Werden die Fluoreszenzlichtimpulse digitalisiert und anhand ihrer Pulshöhe, Pulsfläche oder –dauer bestimmten Kanälen zugeordnet, entsteht ein sogenanntes Histogramm (Ordinate = Pulsfläche oder –dauer (hier: Fluoreszenzintensität), Abszisse = Ereignishäufigkeit), das die grafische Darstellung der gemessenen Expressionsstärke erlaubt.

### **II.6.2. Durchflusszytometer**

Für die durchflusszytometerischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde ein FACSCalibur<sup>®</sup> Durchflusszytometersystem mit Argonlaser (488nm) verwendet (Fa. BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland). Das eingesetzte Hardwaresystem war Apple Macintosh<sup>®</sup>, die zugehörige Auswertesoftware CellQuest<sup>®</sup>.



### **II.6.3. Probanden**

Für die Blutabnahmen standen 10 Patienten und 16 Kontrollpersonen zur Verfügung. Die Kontrollgruppe setzte sich zusammen aus 10 HLA-B27-negativen gesunden, einer HLA-B27-positiven gesunden und 5 HLA-B27-positiven erkrankten, nicht mit TNF-Blockern behandelten, Personen (vgl. Abb. 3). Die Blutabnahme erfolgte in der Patientengruppe bei jeder Visite vor der Infusionsgabe, in der Kontrollgruppe an sechs Terminen im Abstand von zehn Wochen. Die anti-flogistische Therapie der Kontrollpersonen wurde 10 Tage vor der ersten Blutentnahme pausiert.

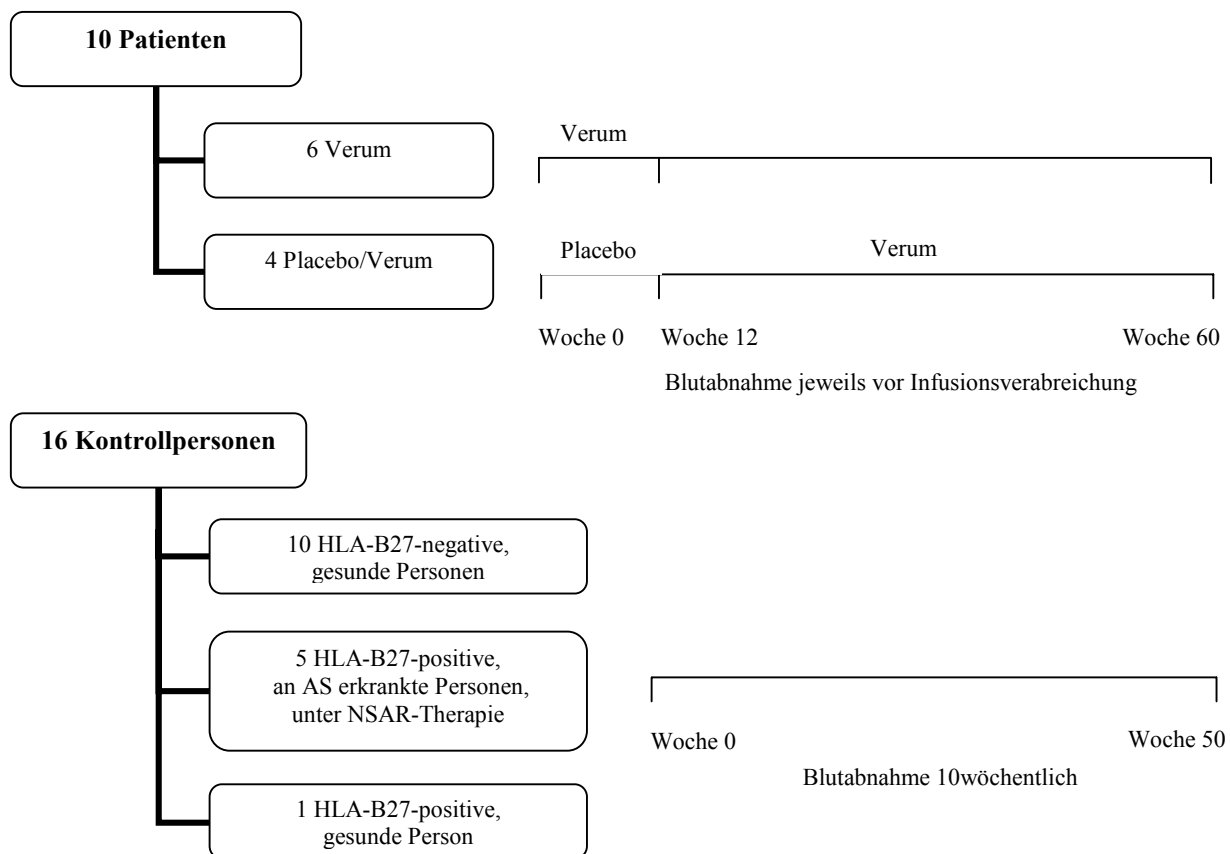
### **II.6.4. Gewinnung der Lymphozyten aus Frischblut**

Es wurden jeweils 36 ml Vollblut in Sodium-Heparin-Röhrchen abgenommen. Nach 1:1-Verdünnung mit RPMI (RPMI 1640, PAA Laboratories GmbH) wurde die PBMC-Fraktion mittels eines Ficoll-Gradienten (Bicoll separating solution, Dichte 1077, Fa. Biochrom) abgetrennt. Hierzu wurden bei einem Zentrifugenrotor von 24,5 cm Durchmesser folgende Einstellungen gewählt: 20 °C, 2000 rpm, 20 min. Die so gewonnene PBMC-Fraktion wurde abpipettiert, mit RPMI gewaschen und für 10 min nochmals zentrifugiert.

Das Zentrifugat wurde in 6 ml RPMI/10%DMSO (Fa. Sigma-Aldrich) /10%FCS (Fa. PAA Laboratories) resuspendiert und sofort in 1 ml-Kryoröhrchen bei Minus-80°C weggefroren.

### **II.6.5. Aufbereitung der Lymphozyten für die Durchflusszytometrie**

Die weggefrorenen PBMC wurden in den Kryoröhrchen in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut und, sobald sie sich aus dem Gefäß abgießen ließen, im noch gefrorenen Zustand sofort in jeweils 12 ml RPMI/10%FCS verdünnt, um die DMSO-Penetration zu minimieren. Bei 4°C, 3500 rpm und einem Rotordurchmesser von 17,5 cm wurden die Zellen 5 min lang abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Pellets in 1 ml PBS (PBS Dubecco's, Fa. Life Technologies) /10%FCS resuspendiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis bei 4°C. Um für die AK-Inkubation äquivalente Mengen an Zellen zu erhalten, wurden jeweils 10 µl der einzelnen Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (Fa. Sigma) versetzt und mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Auf diese Weise konnte die Vitalität der aufbereiteten Zellen bestimmt werden. Die Zellsuspensionen wurden aufgrund des Zählergebnisses mit PBS so weit verdünnt, dass jeweils von  $10^6$  Zellen/ml ausgegangen werden konnte. Die hieraus entnommenen Zellen wurden mit den entsprechenden AK im Dunkeln für 15 min inkubiert. Das Endvolumen betrug jeweils 100 µl. Danach wurden die Zellen in 2,5 ml PBS mit den oben genannten Zentrifugeneinstellungen gewaschen und in 500 µl PBS/1% PFA (Fa. Merck) resuspendiert.



**Abb. 3:** Übersicht über die Probandengruppen und deren Blutentnahmezeitpunkte

### II.6.6. Antikörper

Die Bestimmung der HLA-Oberflächenexpression erfolgte mit einem MHC-Klasse-I-spezifischen und einem MHC-Klasse-II-spezifischen AK. Die Expression von HLA-B27 wurde gesondert betrachtet und mit drei verschiedenen HLA-B27-spezifischen AK durchgeführt. Die verwendeten AK und die daraus zusammengestellten Kombinationen sind den folgenden Tabellen zu entnehmen.

spezifischer Antikörper gegen	Klon	Färbung	eingesetzte Konzentration	Bezugsquelle
HLA-B27	Me1	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	1:1500 *	ATCC
HLA-B27	ABCm <sup>3</sup>	FITC	1:50	Serotec
HLA-B27	FD705	FITC	1:25	Medac
CD3	HIT3	Allophycocyanin (APC)	1:25	BDPharmingen
CD4	RPA-T4	Phycoerythrin (PE)	1:25	Becton Dickinson
CD8	RPT-T8	Allophycocyanin	1:50	Becton Dickinson
CD16	3G8	Phycoerythrin	1:25	BD Pharmingen
CD 16	3G8	FITC	1:25	BD Pharmingen
CD19	4G7	PerCP	1:10	Becton Dickinson
CD19	HIB19	FITC	1:100	BD Pharmingen
MHC-Klasse-I	W6/32	Phycoerythrin	1:25	Serotec
MHC-Klasse-II	L243	PerCP	1:25	Becton Dickinson

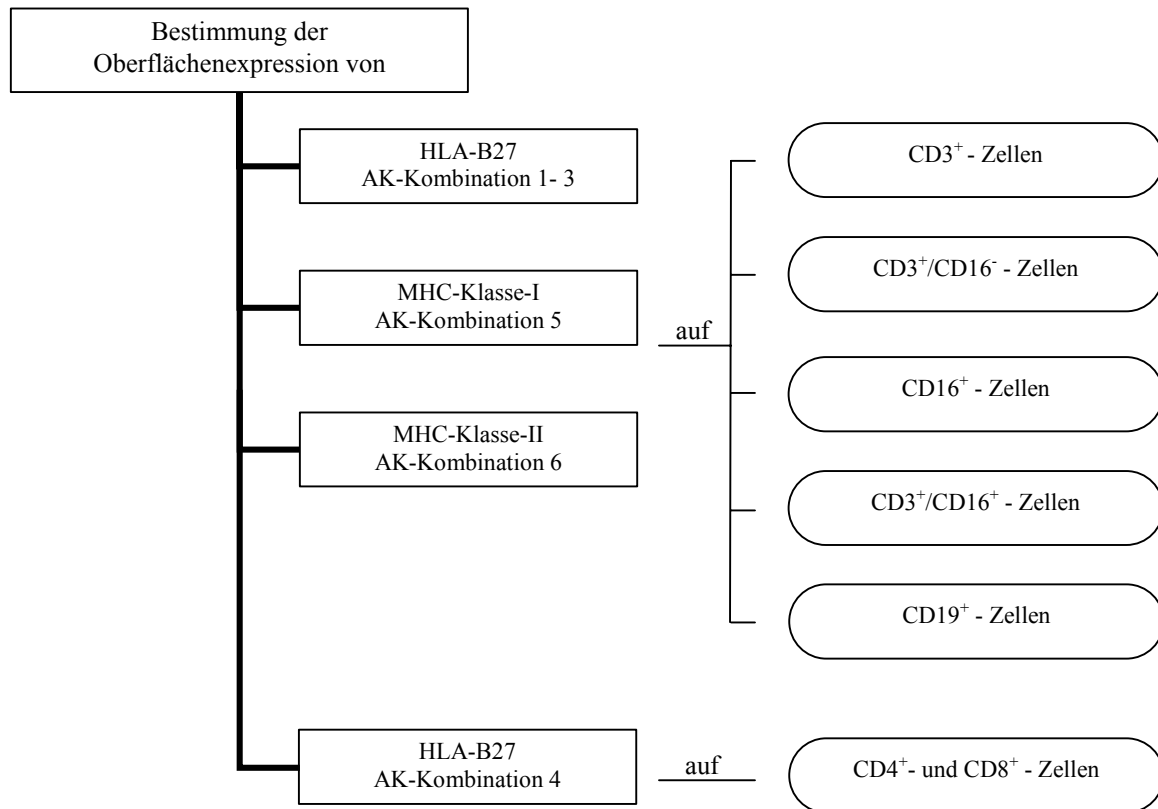
**Tab. 3:** Eingesetzte Antikörper (\* bei einer Konjugatkonzentration 2 mg/ml)

AK-Kombination 1	2	3	4	5	6
B27-FITC (ABCM3) CD16-PE CD19-PerCP CD3-APC	B27-FITC (705) CD16-PE CD19-PerCP CD3-APC	B27-FITC (Me1) CD16-PE CD19-PerCP CD3-APC	B27-FITC (Me1) CD4-PE CD8-APC	CD16-FITC MHC-I-PE CD19-PerCP CD3-APC	CD19-FITC CD16-PE MHC-II-PerCP CD3-APC

**Tab. 4:** eingesetzte AK-Kombinationen

## II.6.7. Bestimmung der HLA-Oberflächenexpression

Bei der durchflusszytometrische Bestimmung der HLA-Oberflächenexpression wurden die einzelnen Lymphozytensubpopulationen separat betrachtet (vgl. Abb. 4).



**Abb. 4:** Übersicht über die analysierten Oberflächenantigene auf den jeweiligen Zellsubpopulationen

T-Lymphozyten wurden über CD3-Positivität, NK-Zellen über CD16-Positivität, NKT-Zellen über CD3/16-Positivität und B-Lymphozyten über CD19-Positivität definiert. Der relative Anteil der jeweiligen Zellpopulationen wurde mit Hilfe der Quadrantenanalyse bestimmt. Die Antigenexpression auf den jeweiligen Subpopulationen wurde mit Histogrammen ermittelt. Als Maß für die Fluoreszenzintensität wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) herangezogen (Kirveskari *et al.*, 1999; Malik *et al.*, 2002). In Abb. 5 ist das Auswerteprinzip der durchflusszytometrischen Daten exemplarisch dargestellt.

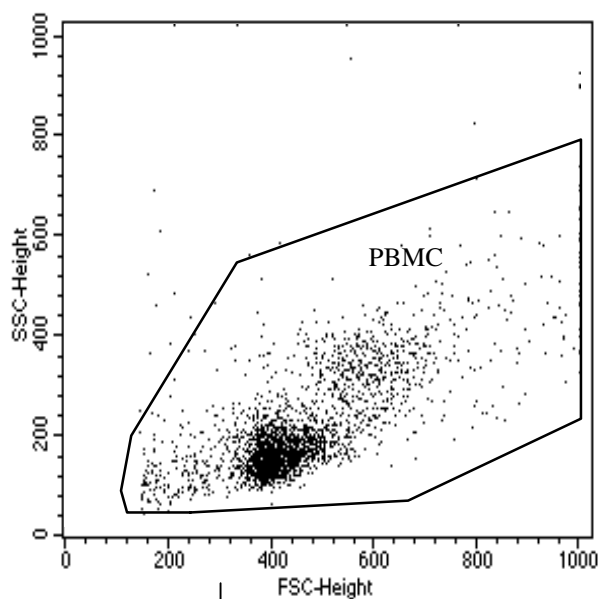
Um technisch bedingte Schwankungen der Durchflusszytometrie zu minimieren, wurden die zu den verschiedenen Visiten gewonnenen Zellen eines Patienten und die zugeordneten Kontrollperson zum gleichen Zeitpunkt analysiert.

#### **II.6.8. Statistik**

Als Statistikprogramm wurde Statsdirekt<sup>®</sup>, Version 2.2.3, verwendet. Für die Signifikanzberechnung wurde nach Prüfung auf Normalverteilung der Werte der single sample t test als parametrischer Test angewandt.

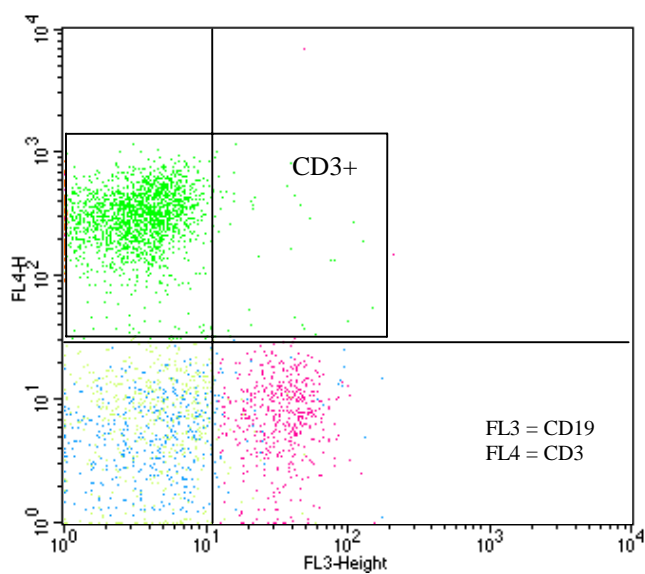
Die Korrelation wurde als einfache lineare bzw. multiple lineare Regression berechnet.

### Aufnahmefenster

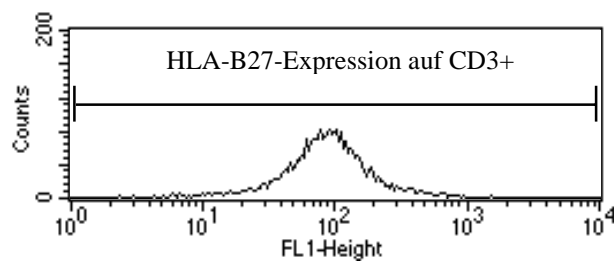


FSC = Forward Scatter, SSC = Side Scatter

### Dotplots mit jeweiligen Lymphozytengates und Quadrantenanalyse



### Ermittlung der HLA-B27-Expression im Histogramm

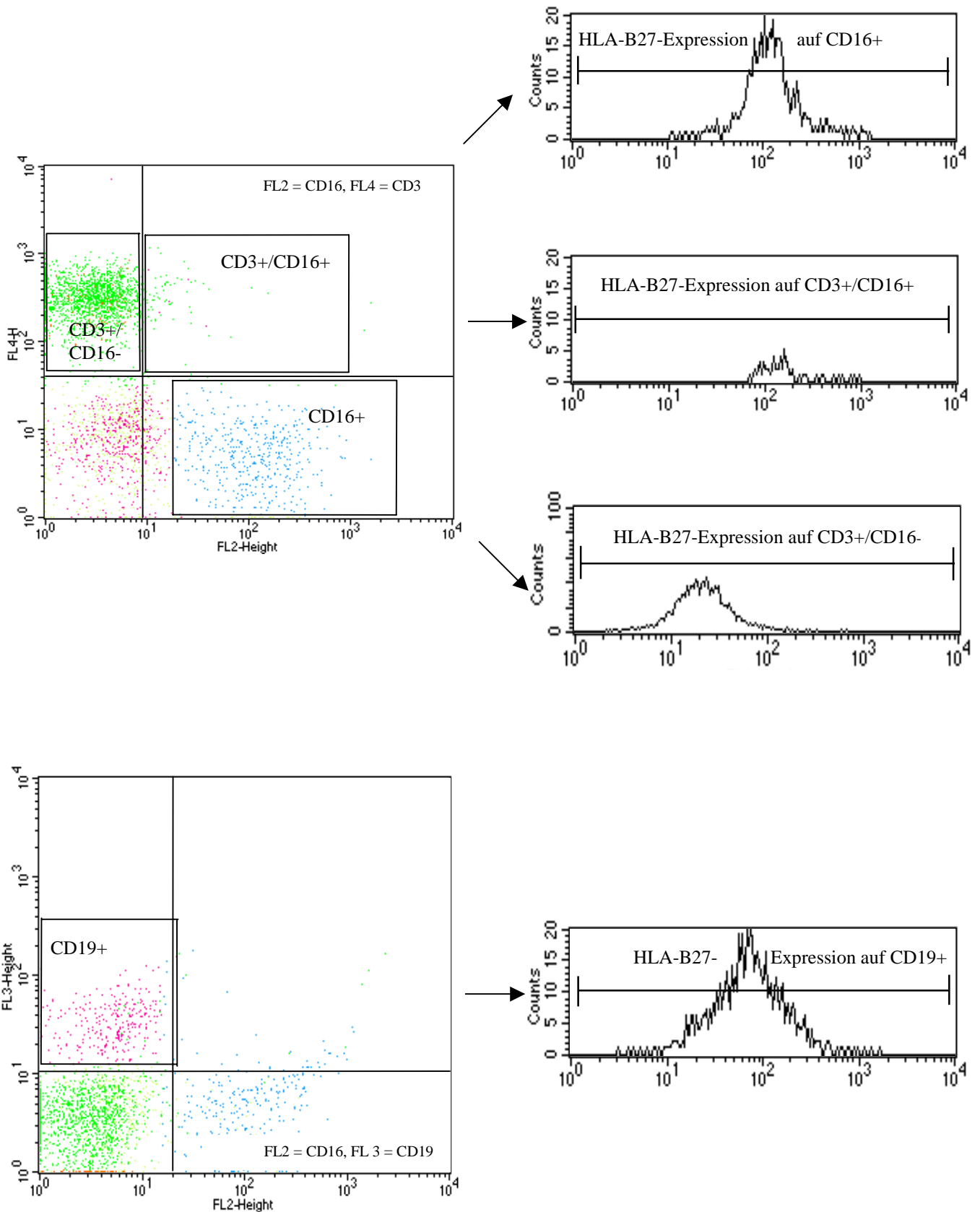


FL = Fluoreszenzintensität,  
Counts = Ereignishäufigkeit

Quad Location: 17, 33

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	5546	55.77	54.98
UR	65	0.65	0.64
LL	2913	29.29	28.88
LR	1421	14.29	14.09

Mean	Geo Mean	Median	Peak Ch
102.87	83.97	85.05	74
102.87	83.97	85.05	74



**Abb. 4:** Ermittlung der Expressionsstärke anhand von Histogrammen.  
 Exemplarische Darstellung des Auswertepinzips am Beispiel der HLA-B27-Expression.  
 Die Zahlenwerte der Quadrantenanalyse und Mittelwerte sind aus Platzgründen nur einmal aufgeführt.

### **III. ERGEBNISSE<sup>3</sup>**

#### **III.1. EIGENSCHAFTEN DER PATIENTENGRUPPE**

Von den 10 rekrutierten Patienten waren 7 Teilnehmer der TNF-AS-2-Studie, 3 wurden im Rahmen eines individuellen Heilversuchs außerhalb der Studie therapiert. Alle 10 Patienten wurden durch PCR-Diagnostik als HLA-B27-Träger identifiziert.

PATIENT (I/G)	R	A (JAHRE)	ED (JAHRE)	BISHERIGE THERAPIEN
1 (A.H./m)	P/V	30	14	NSAR, physikalische Therapie
2 (B.B./m)	V	43	29	NSAR, physikalische Therapie
3 (C.P./m)	V	38	23	Sulfasalazin, NSAR, physikalische Therapie
4 (D.P./m)	P/V	30	14	NSAR, physikalische Therapie
5 (F.S./m)	V	32	21	Sulfasalazin, Glucocorticoide, Resochin, Methotrexat, NSAR, Endoprothese Hüfte links
6 (H.T./m)	V	42	25	Sulfasalazin, Glucocorticoide, NSAR,
7 (M.M./w)	P/V	43	26	Glucocorticoide, NSAR, physikalische Therapie
8 (M.S./w)	V	37	17	Glucocorticoide, Gold, NSAR, Endoprothese Hüfte li
9 (T.P./m)	P/V	58	39	Sulfasalazin Glucocorticoide, Resochin, Methotrexat, Gold, NSAR
10 (W.F./m)	V	44	30	NSAR

**Tab. 5:** Eigenschaften der Patientengruppe (Abk.: I = Initialen, G = Geschlecht, R = Randomisierung: V = Verum, P = Placebo, A = Alter, ED = Erkrankungsdauer)

Die 7 Studienteilnehmer erhielten innerhalb des 60wöchigen Beobachtungszeitraumes 12 Infusionen. Da die Studie sekundär verlängert wurde, konnten bei den Studienpatienten keine Daten einer Nachbeobachtungsphase erhoben werden. Bei den außerhalb der Studie therapierten Patienten wurde die Behandlung nach 10 Infusionen unterbrochen, in diesen Fällen liegen zusätzlich Ergebnisse einer 12wöchigen Nachbeobachtungsphase vor.

#### **III.2. ERGEBNISSE ZUR KLINISCHEN FRAGESTELLUNG**

##### **III.2.1. Beeinflussung der klinischen Krankheitsaktivität**

In Phase a erreichten alle 6 Verum-Patienten eine Verbesserung des BASDAI um mehr als 50% und konnten definitionsgemäß als Responder eingestuft werden (vgl. Abb. 6). Die Patienten der Placebogruppe zeigten keine Verbesserung. In Phase b hielt dieser Effekt bei 8 Patienten an. Bei einem Patienten (HT) nahm die Therapiewirksamkeit nach initial gutem Therapieerfolg in Woche 18

<sup>3</sup> Soweit nicht anders erwähnt, gelten für die Abbildungen folgende Zuordnungen:

Pat MM □, Pat FS ■, Pat TP Δ, Pat HT ▲, Pat DP ◇, Pat CP ◆, Pat AH ○, Pat WF ●, Pat MS ★, Auslassversuch -----

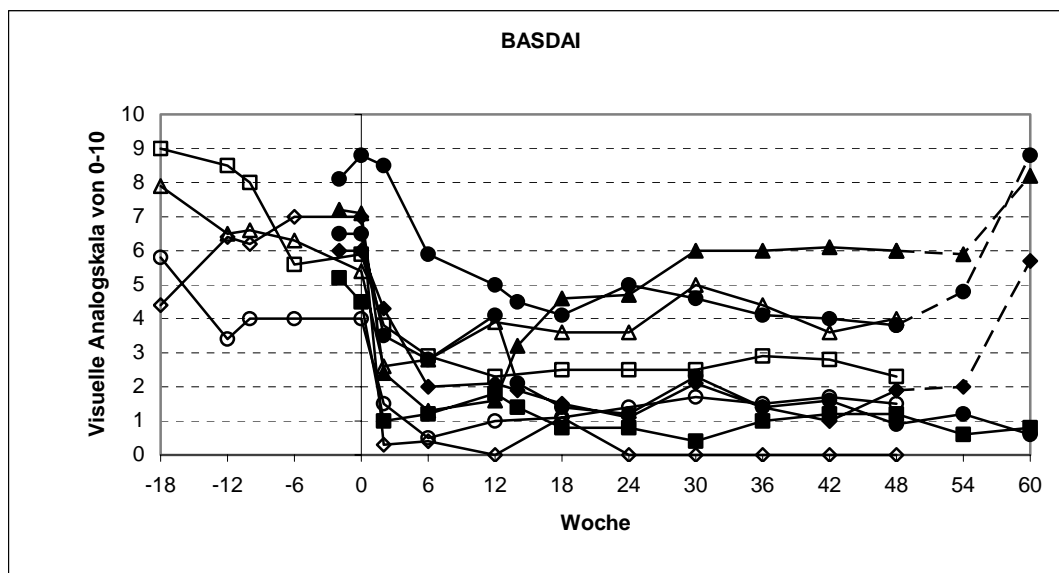
wieder ab, bei einem weiteren Patienten (BB) musste die Therapie in Woche 36 aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen abgebrochen werden (s. III.2.4.).

BASFI, Schmerzscore, globales Patientenurteil, globales Arzturteil als weitere Aktivitätsparameter zeigten einen zum BASDAI analogen Verlauf. Die Verbesserung der Aktivitätsindices setzte sowohl in der Verumgruppe als auch in der Placebo/Verumgruppe bereits nach der ersten Veruminfusion ein. Der maximale Therapieeffekt wurde nach ca. 3 Infusionen erreicht. Bei 3 Patienten wurde die Therapie nach Woche 48 abgesetzt, woraufhin eine prompte Verschlechterung des BASDAI zu beobachten war (vgl. Abb. 7).

Vor Therapiebeginn bestehende Enthesitiden (3/10) und Arthritiden (2/10) bildeten sich nach durchschnittlich 2 Veruminfusionen zurück. Bestehende Arthralgien (8/10) besserten sich bei 5 Patienten nach durchschnittlich 2 Infusionen, bei 3 Patienten blieben diese von der Anti-TNF-Therapie unbeeinflusst.

9/10 Patienten benötigten bei Therapiebeginn NSAR. Der NSAR-Bedarf konnte nach durchschnittlich 3 Veruminfusionen bei 2 Patienten auf 50 % bzw. 15 % der Ausgangsmenge reduziert, bei 5 Patienten vollständig abgesetzt werden. Bei den Patienten BB und HT musste die NSAR-Behandlung wieder aufgenommen werden.

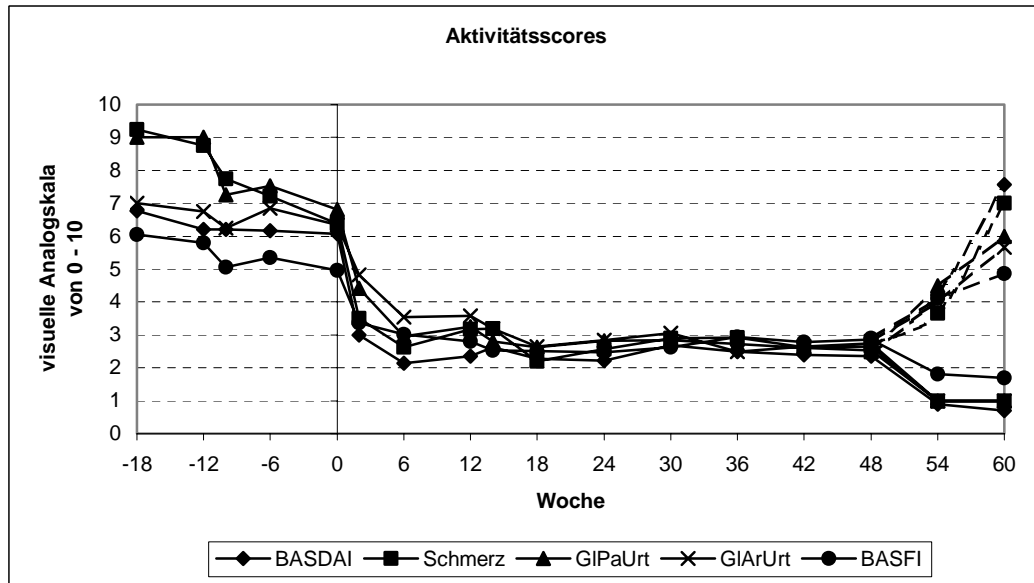
Der BASMI verbesserte nach durchschnittlich 2 Veruminfusionen bei 7/10 Patienten um einen Punktwert. Nach durchschnittlich 5 Verumgaben konnte in Phase b eine nochmalige Verbesserung um einen weiteren Punktwert erreicht werden. Bei 3 Patienten blieb der Bewegungsindex langfristig unverändert (vgl. Abb. 8).



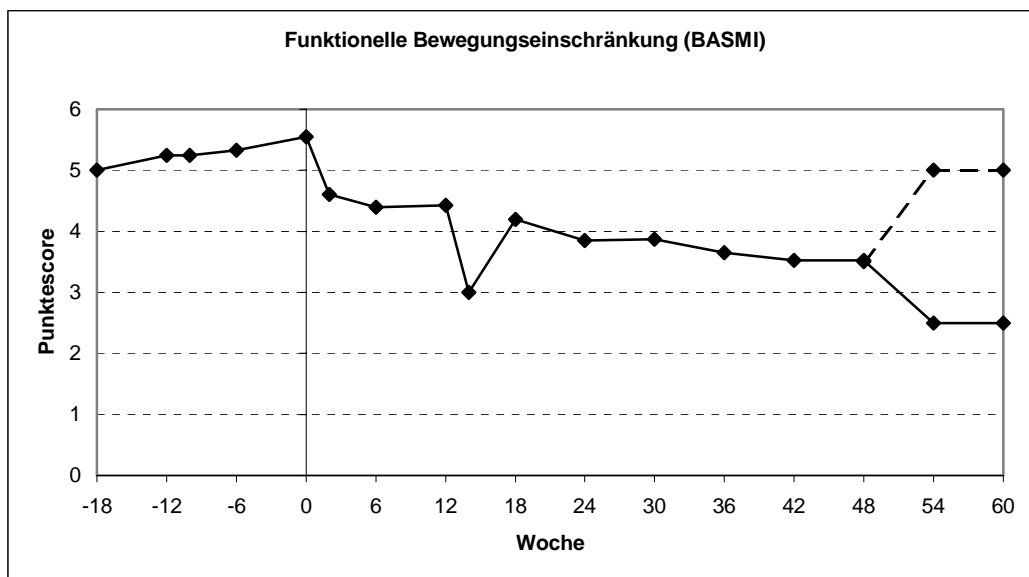
**Abb. 6:** Verbesserung des BASDAI als Maß für die Krankheitsaktivität, dargestellt als Einzelverläufe<sup>4</sup>  
Aus Gründen der Vergleichbarkeit zwischen Verum- und Placebogruppe wurde die Placebophase virtuell zurückverlegt. Zeitpunkt 0 entspricht der ersten Verumgabe.

<sup>4</sup> ohne Berücksichtigung von Pat. BB





**Abb. 7.** Verbesserung der Aktivitätsscores, dargestellt als Mittelwerte<sup>5</sup>  
(GIPaUrt = globales Patientenurteil, GIaUrt = globales Arzturteil)



**Abb. 8:** Verbesserung der Beweglichkeit, dargestellt als Mittelwerte<sup>5</sup>

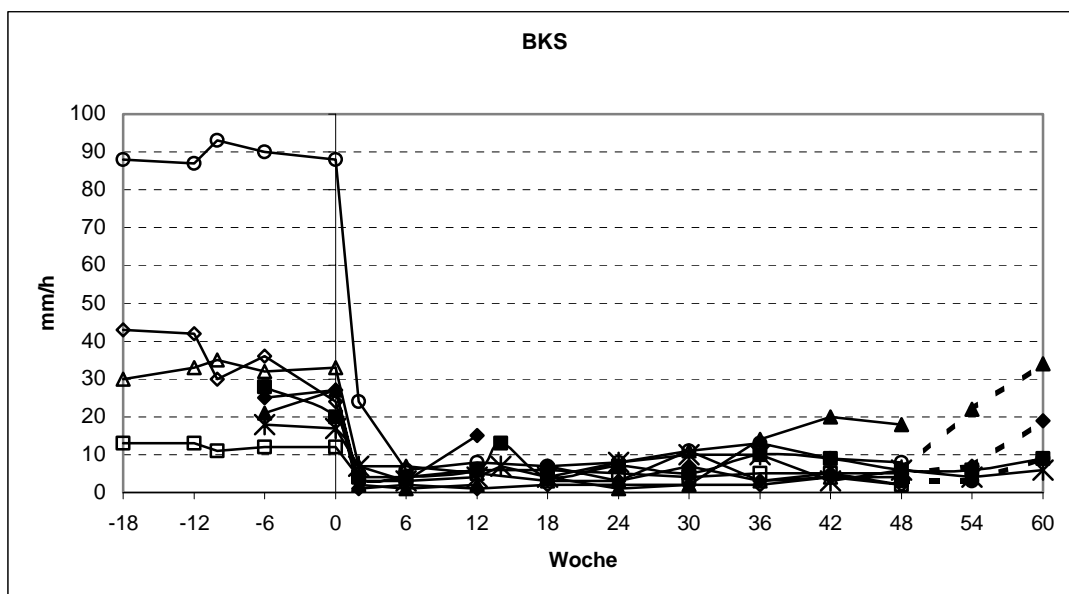
<sup>5</sup> ohne Berücksichtigung von Pat. BB, Standardabweichungen s. VIII.3.1

### III.2.2. Beeinflussung der laborchemischen Entzündungsparameter

9/10 Patienten wiesen vor Therapiebeginn ein erhöhtes CRP (Mittelwert 3,8 mg/dl) und eine erhöhte BKS (Mittelwert 66 mm/h) auf. Sowohl in der Verumgruppe als auch in der Verum/Placebogruppe normalisierten sich die Entzündungsparameter nach der ersten Veruminfusion in Phase a. In Phase b hielt dieser Effekt bei allen als Responder eingestuften Patienten an.

Der nachlassende Therapieerfolg bei Pat. HT war begleitet von einem Anstieg der Entzündungsparameter auf die Ausgangswerte vor Therapiebeginn.

Nach Absetzen der Therapie konnte in der 12wöchigen Nachbeobachtungsphase ebenfalls ein leichter Anstieg der Entzündungsparameter beobachtet werden.



**Abb. 9:** Normalisierung der BKS<sup>6</sup>. Analoger Verlauf beim CRP.

<sup>6</sup> ohne Berücksichtigung von Pat. BB

### III.2.3. Beeinflussung des kernspintomografischen Befunds

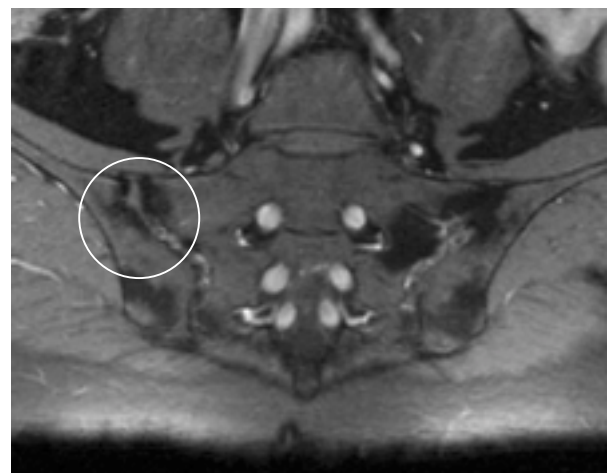
Vor Therapiebeginn konnte in der kernspintomografischen Aufnahme bei einem Patienten (AH) eine aktive Spondylitis, bei drei Patienten (CP, DP, FS) eine aktive ISG-Arthritis unter fortgeführter NSAR-Therapie nachgewiesen werden. Bei den Kontrollaufnahmen in den Wochen 14 und 60 war bei keinem dieser Patienten eine pathologische Kontrastmittelaufnahme sichtbar.



Vor Therapiebeginn



Woche 14



**Abb. 10:** Kernspintomografische Befunde (STIR-Sequenz) der Pat. AH (oberes Bildpaar) und CP (unteres Bildpaar). Die spinale bzw. ileosakrale Kontrastmittelanreicherung vor Therapiebeginn (links) war in Woche 14 (rechts) nicht mehr nachweisbar.

### III.2.4. Therapiesicherheit und Therapieverträglichkeit

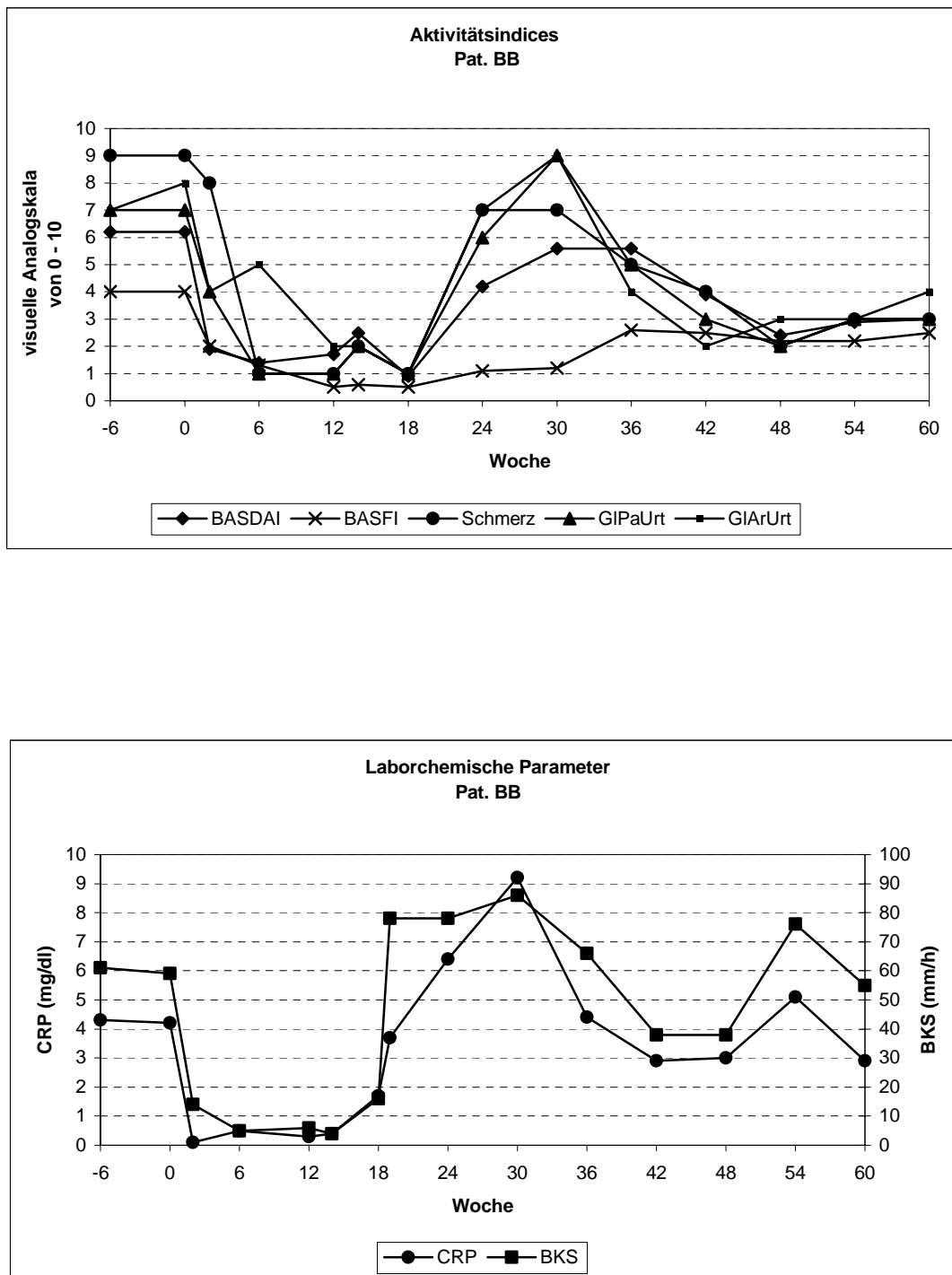
Insgesamt wurde die Anti-TNF-Therapie gut vertragen. Häufigste infusionsassoziierte Nebenwirkungen waren Übelkeit (4/10) mit unregelmäßig verbundenem Erbrechen (2/10) und Kopfschmerzen (3/10). In zwei Fällen traten während der Infusion leichte anaphylaktoide Reaktionen mit Hitzegefühl und Flush auf, die mit der intravenösen Verabreichung von Antihistaminika beherrschbar waren.

Es konnte keine Häufung von Infekten im Therapieverlauf beobachtet werden. Die Prävalenz von Infekten war in Verum- und Placebogruppe gleich und lag im gesamten Beobachtungszeitraum bei 2/10. Es handelte sich um Affektionen der oberen Atemwege, die eine 2wöchige Therapie mit Antibiotika notwendig machten. Bei allen Patienten war der Tuberkulintest vor Studienbeginn negativ, unter Therapie gab es keine Hinweise auf die Reaktivierung einer Tuberkulose.

Vor Therapiebeginn waren bei keinem Patienten ANA nachweisbar. Im Therapieverlauf entwickelten 6/10 Patienten ANA mit Titerwerten zwischen 1:100 und 1:3200. Der ANA-Titer normalisierte sich in der 12wöchigen Nachbeobachtungsphase nicht. Mit Ausnahme eines Patienten (Pat. BB, s.u.) korrelierte der Anstieg des ANA-Titers weder mit einem Verlust an therapeutischer Wirksamkeit, noch mit der Zunahme von Nebenwirkungen.

Nach der 6. Veruminfusion entwickelte Pat. BB im Anschluss an einen Thailandaufenthalt eine ikterisch verlaufende Hepatitis (max. GOT: 420 U/l, max. GPT: 410 U/l, max. Gesamtbilirubin: 5,7 mg/dl). Es konnte kein Erregernachweis geführt werden. Aufgrund der schnellen Normalisierung der Transaminasen wurde die Therapie unter Einhaltung des Infusionsintervalls zunächst fortgeführt. Nach der 8. Veruminfusion zeigte der Patient bei einem ANA-Titer von 1:800 lupus-ähnliche Symptome mit Myalgien der proximalen Extremitätenmuskulatur, peripheren Arthritiden und Entzündungszeichen (CRP 4,4 mg/dl, BKS 66 mm/h). Unter dem Verdacht eines medikamenten-induzierten Lupus-Syndroms wurde die Infliximab-Therapie in Woche 36 abgebrochen.

Es schloss sich eine 3monatige Therapie mit oralen Steroiden (Dosierungen zwischen 30 – 5 mg/d) und NSAR (200 mg Celecoxib/d) an. In diesem Zeitraum blieben die Entzündungszeichen erhöht (CRP zwischen 2,1 und 11,16 mg/dl, BKS zwischen 38 und 90 mm/h), der ANA-Titer zwischen 1:200 und 1:800. Die Aktivitätsindices stabilisierten sich bei ca. 50% der Ausgangswerte vor Therapiebeginn (vgl. Abb. 11).



**Abb. 11:** Verlauf der Aktivitäts- und Laborparameter bei Pat. BB  
Zwischen Woche 18 und 22 Transaminasenerhöhung, in Woche 36 Studienabbruch mit anschließender oraler Corticosteroidtherapie.

### **III.3. ERGEBNISSE ZUR EXPERIMENTELLEN FRAGESTELLUNG<sup>7</sup>**

Aufgrund der geringen Anzahl von CD3<sup>+</sup>/16<sup>+</sup>-Zellen in den untersuchten Blutproben wurde auf eine separate Betrachtung der CD3<sup>+</sup>/16<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>/16<sup>-</sup>-Subpopulation verzichtet und eine Analyse aller CD3<sup>+</sup>-Zellen als Gesamtpopulation der T-Lymphozyten vorgenommen.

#### **III.3.1. HLA-B27-Oberflächenexpression**

Zwischen der 18. und 30. Therapiewoche (entspricht der 5. bzw. 7. Veruminfusion) setzte innerhalb des Patientenkollektivs<sup>8</sup> eine *Zunahme der HLA-B27-Oberflächenexpression* ein. Dieser Trend hielt im weiteren Behandlungsverlauf an, wobei der Expressionsanstieg nicht kontinuierlich war, sondern intermittierend-periodisch, im Wechsel mit transienten Abnahmen. Ein periodischer Wechsel zwischen zunehmender und abnehmender Expressionsstärke war teilweise bereits nach der ersten Veruminfusion zu beobachten, ohne dass hieraus eine definitive Expressionszunahme resultierte, da die HLA-B27-Oberflächenexpression nach vorangegangener Zunahme wieder auf bzw. unter das Ausgangsniveau zurückfiel (vgl. Abb. 12 und 13).

Die Zunahme der HLA-B27-Oberflächenexpression war in Abhängigkeit von verwendetem AK und jeweiliger Lymphozytensubpopulation unterschiedlich stark nachweisbar (vgl. Abb.12 und 15).

Auf den *B-Lymphozyten* war der Anstieg am deutlichsten ausgeprägt und mit allen 3 HLA-B27-AK signifikant ( $p \leq 0,03$ ).

Auf den *NK-Zellen* war bei Pat. CP eine Abnahme der FD705- und ABCm<sup>3</sup>-Signale zu beobachten. In den übrigen Fällen kam es ebenfalls zur Expressionszunahme, die mit ABCm<sup>3</sup> und Me1 signifikant ( $p \leq 0,01$ ), mit FD705 nicht signifikant war.

Auf den *T-Lymphozyten* war die Zunahme der HLA-B27-Expression am geringsten ausgeprägt, jedoch ebenfalls mit ABCm<sup>3</sup> und Me1 signifikant ( $p \leq 0,04$ ), mit FD705 nicht signifikant.

Die HLA-B27-Expression auf den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen wurde nur unter Verwendung des Me1-AK bestimmt, hierbei war eine Zunahme um den Faktor 1,5 – 2,5 zu beobachten. Die Expressionsverläufe beider Lymphozytensubtypen verhielten sich analog.

Bei Pat. HT (sekundärer Therapieversager) nahm die HLA-B27-Oberflächenexpression unter Infliximabtherapie ebenfalls zu. Der nachlassende Therapieerfolg bedingte kein von den übrigen Patienten abweichendes Verhalten der Expressionsstärke.

Bei dem aus der Studie ausgeschiedenen Pat. BB war unter Verumgabe auf allen Lymphozytensubpopulationen eine Expressionsabnahme zu beobachten. Die Transaminasenerhöhung

<sup>7</sup> statistische Auswertung s. VIII

<sup>8</sup> ohne Berücksichtigung von Pat. BB

ging mit einer passageren Zunahme der HLA-B27-Oberflächenexpression einher. Bezogen auf alle 3 HLA-B27-AK war die Expression zum Abbruchzeitpunkt in Woche 36 auf den T-Lymphozyten um das 2,4fache, auf den NK-Zellen um das 2fache, auf den B-Lymphozyten um das 2,1fache geringer als zum Zeitpunkt der Erstmessung. Nach Woche 36 (Studienabbruch) konnte eine Zunahme der HLA-B27-Expressions gemessen werden. Am Ende des verlängerten Beobachtungszeitraumes (Woche 79) lag die HLA-B27-Expression auf den T-Lymphozyten bei, auf den NK-Zellen und B-Lymphozyten unter den Ausgangswerten (vgl. Abb. 14).

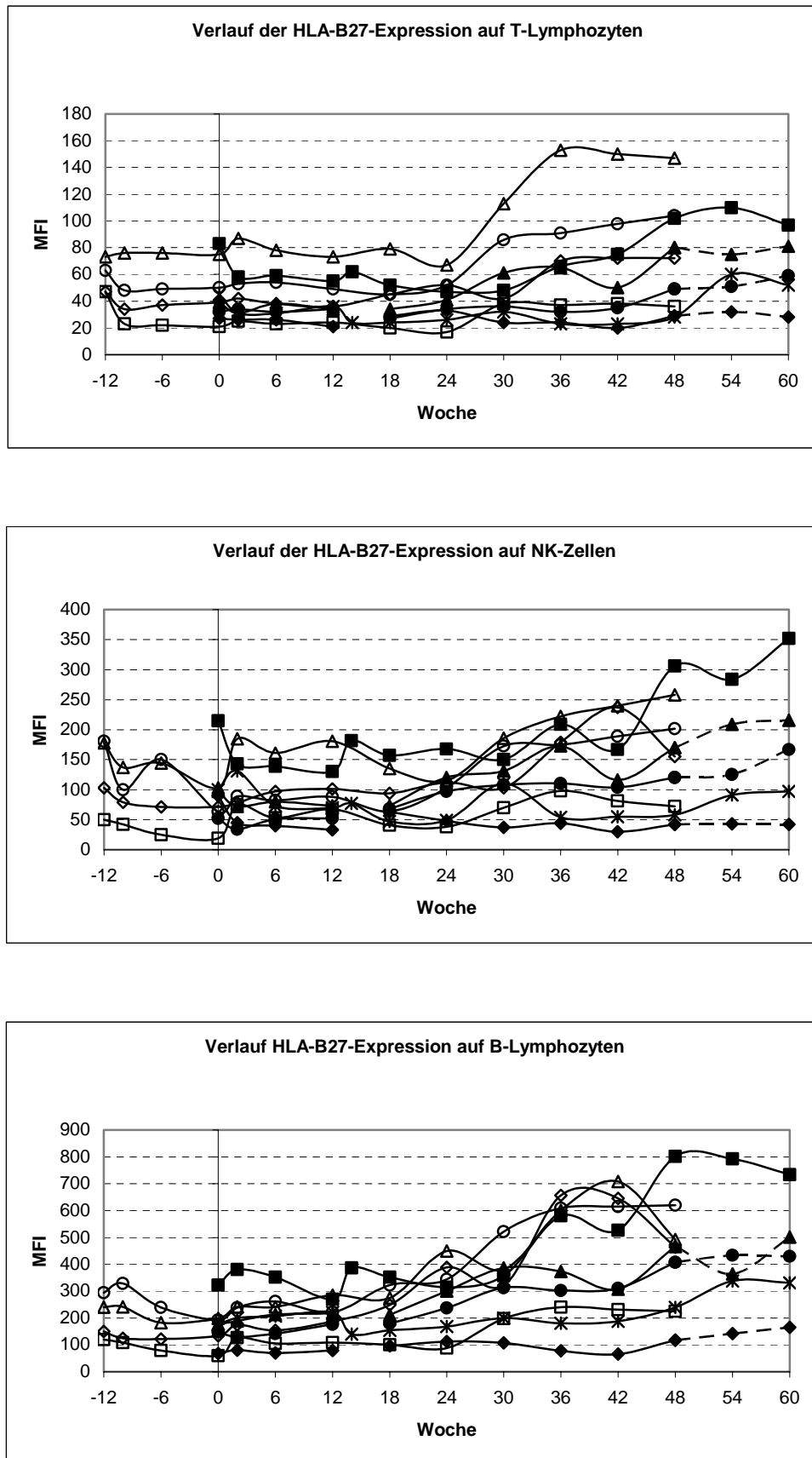
Innerhalb der HLA-B27-Negativkontrollen war bei 2/10 Probanden zwischen Woche 0 und 50 ein Anstieg der Oberflächenexpression auf allen drei Subpopulationen zu messen (zwischen Faktor 1,4 – 2,2). Bei den anderen HLA-B27-negativen Probanden blieb die HLA-B27-Expression unbeeinflusst oder fiel leicht ab.

Bei den erkrankten HLA-B27-Positivkontrollen fielen im Verlauf intraindividuelle Schwankungen der HLA-B27-Expression auf. Es zeichnete sich kein mehrheitlicher Trend des Expressionsverhaltens ab. Bezogen auf den Gesamtverlauf ergaben sich im Vergleich von Woche 0 mit Woche 50 folgende Konstellationen: bei 2 der 5 Kontrollpersonen waren die Messwerte auf allen Subpopulationen stabil, bei 2 Personen war eine auf T-Lymphozyten beschränkte Zunahme der Expression (Faktor 1,3 und 1,5), bei einer weiteren eine Expressionsabnahme auf allen Subpopulationen (zwischen Faktor 1,2 – 1,5) zu beobachten.

Die Oberflächenexpression der gesunden HLA-B27-positiven Kontrollperson blieb auf allen Subpopulationen weitgehend konstant.

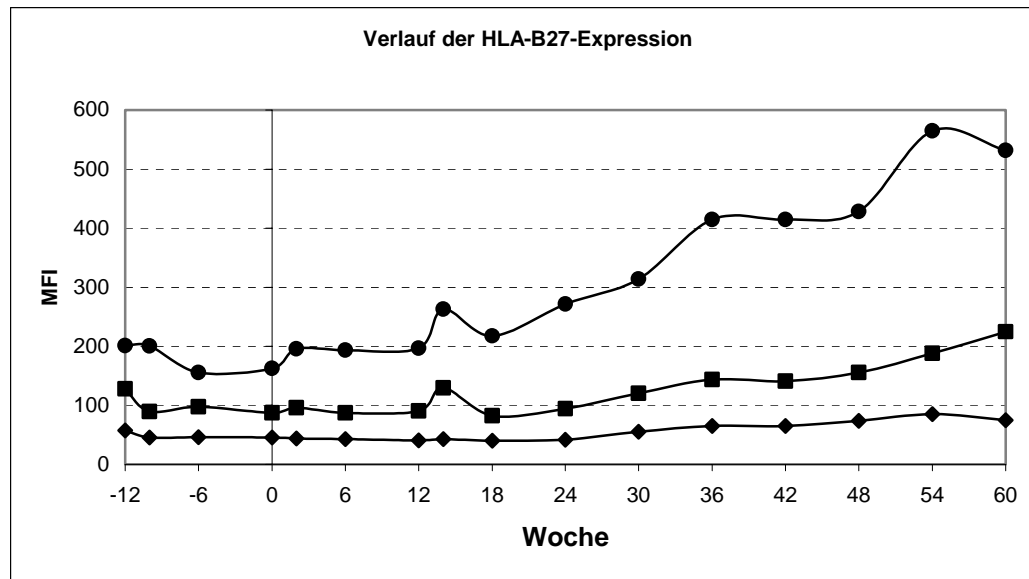
Sowohl in der Patienten- als auch in den Kontrollgruppen korrelierten die Expressionsverläufe der eingesetzten 3 HLA-B27-AK miteinander (multipler Korrelationskoeffizient (R) = 0,8 und 0,9). Der Faktor der Expressionsveränderung variierte teilweise (vgl. Abb. 15).

Die Auswertung der unspezifischen AK-Bindung bei den HLA-B27-negativen Proben ergab Unterschiede in der Spezifität der verwendeten HLA-B27-AK. Me1 zeigte mit Ausnahme von zwei Kontrollpersonen, die vermutlich durch Kreuzreaktivität mit HLA-B7 bedingt sind (Levering *et al.*, 2000; Levering *et al.*, 2002), die geringste Bindung bei HLA-B27-negativen Proben. ABCm<sup>3</sup> wies die höchste Bindung bei den Negativkontrollen auf, FD705 nahm eine Mittelstellung ein. Mit FD705 wurde im Verlauf die beste Reproduzierbarkeit der Messwerte erreicht, weswegen für die folgenden grafischen Darstellungen die mit diesem AK ermittelten Werte gewählt wurden.

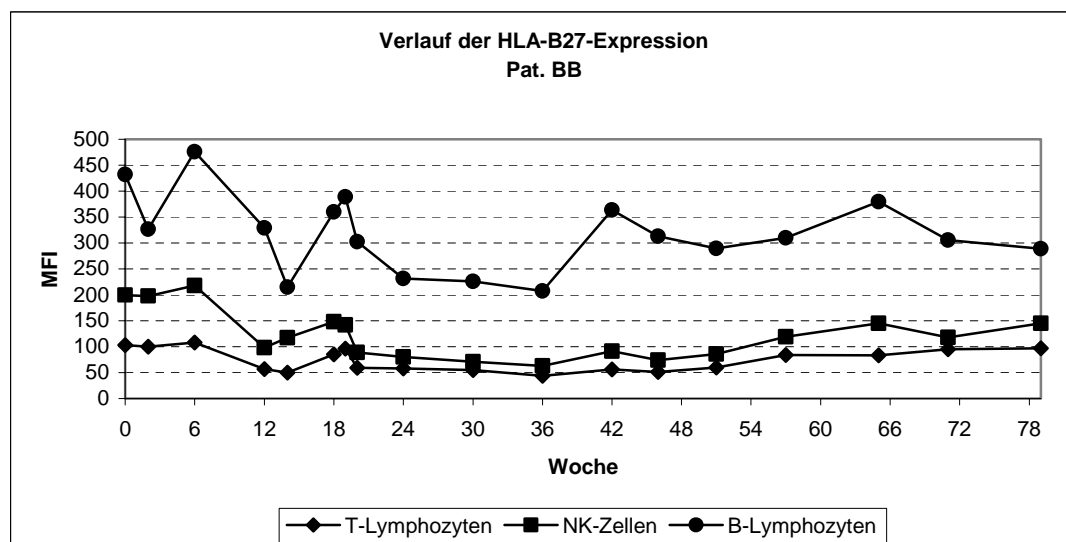


**Abb. 12:** Exemplarische Darstellung der HLA-B27-Expressionszunahme auf T-Lymphozyten, NK-Zellen und B-Lymphozyten unter Infliximabtherapie am Beispiel des FD705-AK (ohne Berücksichtigung von Pat. BB)

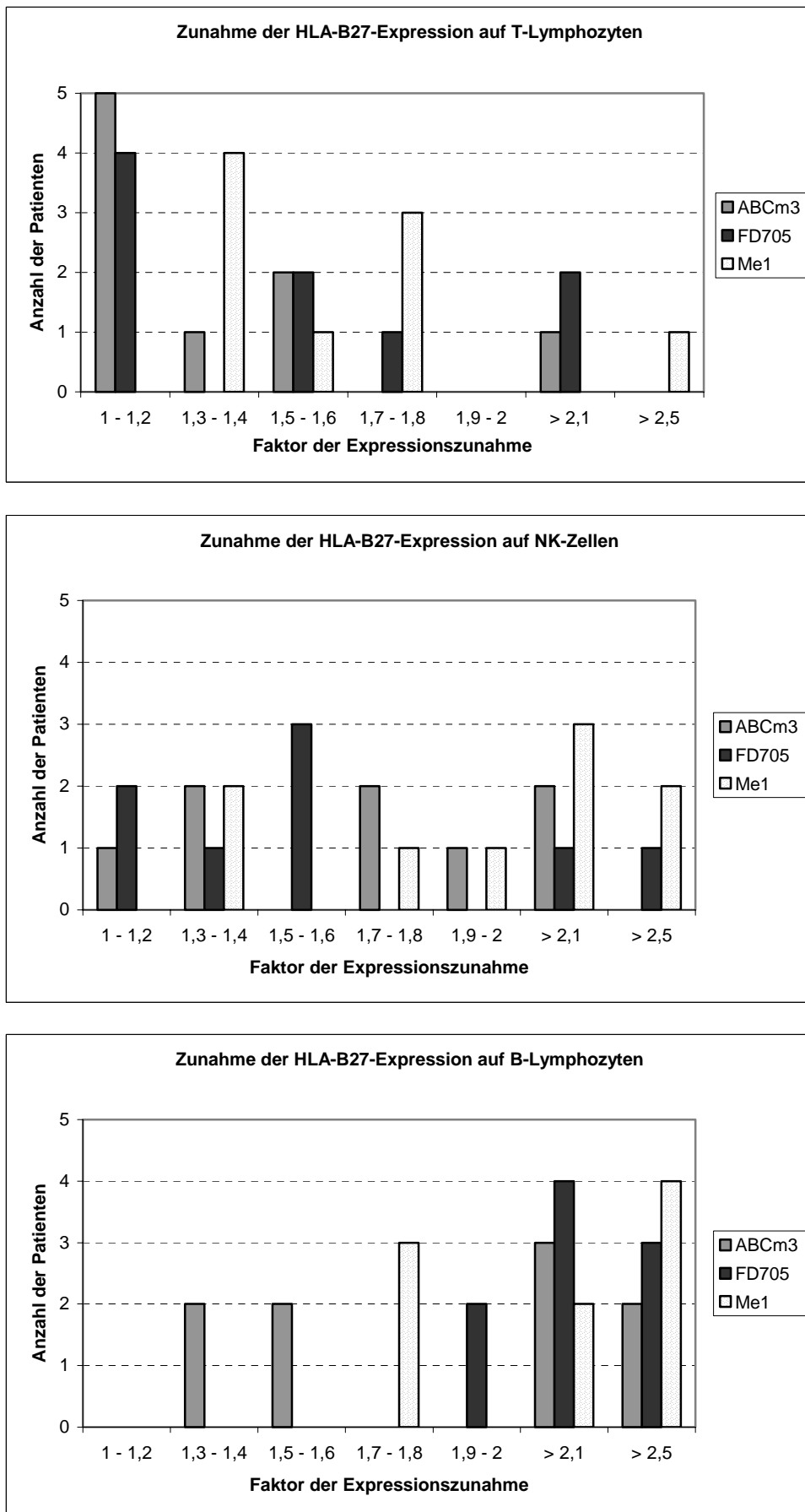




**Abb. 13:** HLA-B27-Expressionsszunahme auf T-Lymphozyten, NK-Zellen und B-Lymphozyten unter Infliximabtherapie, dargestellt als Mittelwerte aller Patienten am Beispiel des FD705-AK (ohne Berücksichtigung von Pat. BB und der Auslassversuche in Woche 54 – 60).



**Abb. 14:** Verlauf der HLA-B27-Expression auf T-Lymphozyten, NK-Zellen und B-Lymphozyten bei Pat. BB am Beispiel des FD705-AK.  
Zwischen Woche 18 und 22 Transaminasenerhöhung, in Woche 36 Studienabbruch mit anschließender oraler Corticosteroidtherapie.



**Abb. 15:** Zunahme der HLA-B27-Expression in Abhängigkeit von verwendetem B27-AK und jeweiliger Lymphozytensubpopulation. Verglichen sind jeweils die Messwerte der Wochen 0 und 60 (ohne Berücksichtigung von Pat. BB).

### III.3.2. MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression

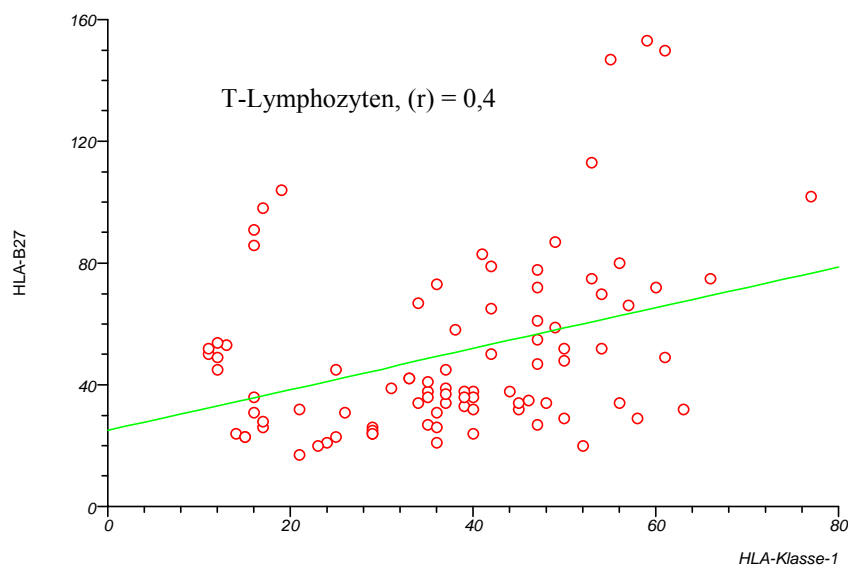
Der Verlauf der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression unterlag intra- und interindividuellen Schwankungen. Tendenziell ergab sich ein Expressionsanstieg, der im single sample t test auf NK-Zellen ( $p = 0,01$ ) und B-Lymphozyten ( $p \leq 0,003$ ) signifikant, auf den T-Lymphozyten ( $p > 0,07$ ) nicht signifikant war.

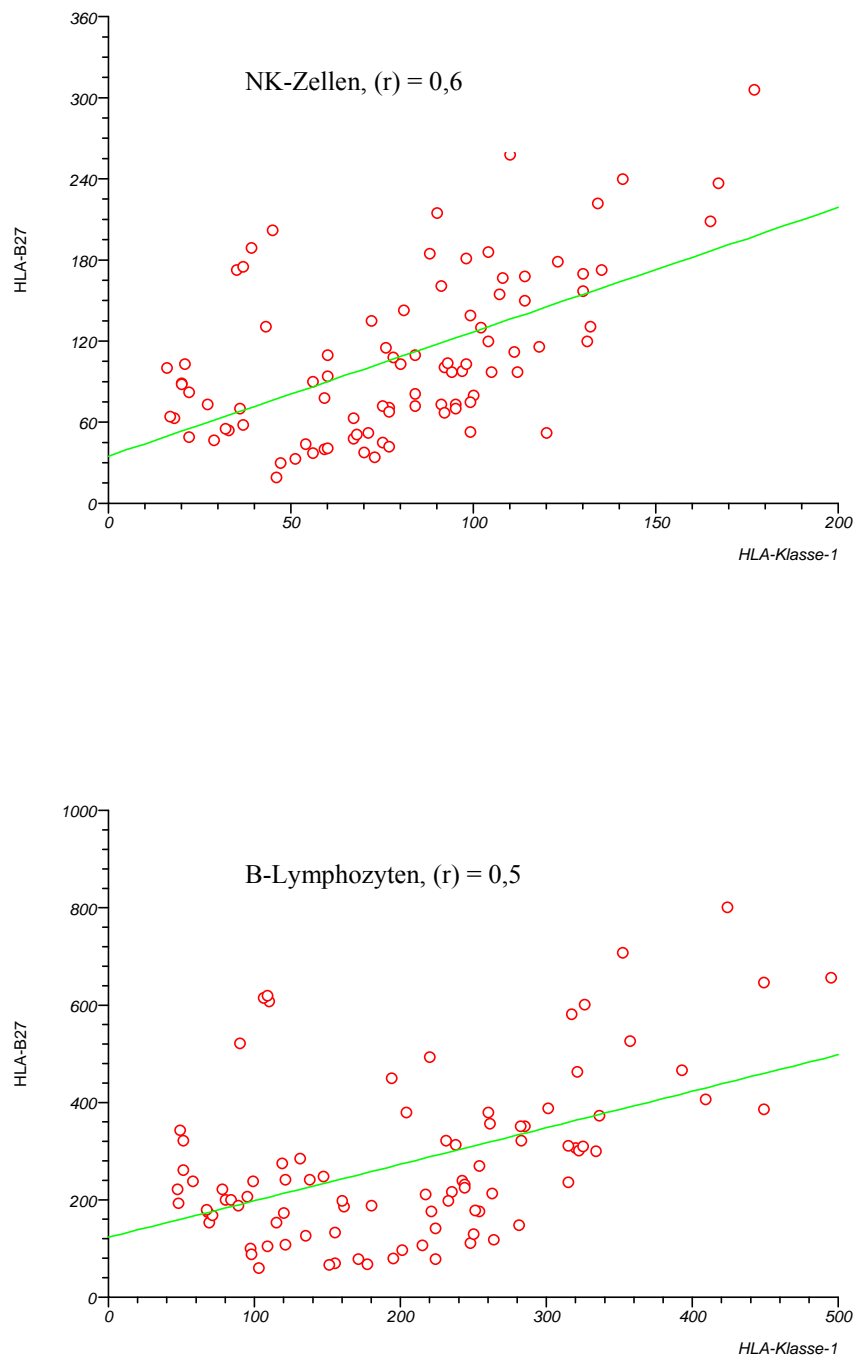
Zwischen dem Verlauf der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression bestand keine signifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient ( $r$ ) zwischen 0,1 und 0,6; vgl. Abb. 16).

Bei den HLA-B27-negativen Kontrollpersonen war in Woche 50 in einem Fall eine auf B-Lymphozyten beschränkte Verdoppelung der MHC-Klasse-I-Expression zu beobachten. Ansonsten blieb die MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression während des gesamten Beobachtungszeitraumes im Wesentlichen unverändert.

Innerhalb der HLA-B27-positiven Kontrollpersonen variierte die MHC-Klasse-I-Expression in einem Fall um den Faktor 1,2, bei allen anderen Positivkontrollen blieb die MHC-Klasse-I-Expression unbeeinflusst.

Wie bei den Patienten bestand auch bei den Kontrollpersonen keine signifikante Korrelation zwischen den Verläufen der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression (Korrelationskoeffizient ( $r$ ) zwischen 0,1 und 0,6).





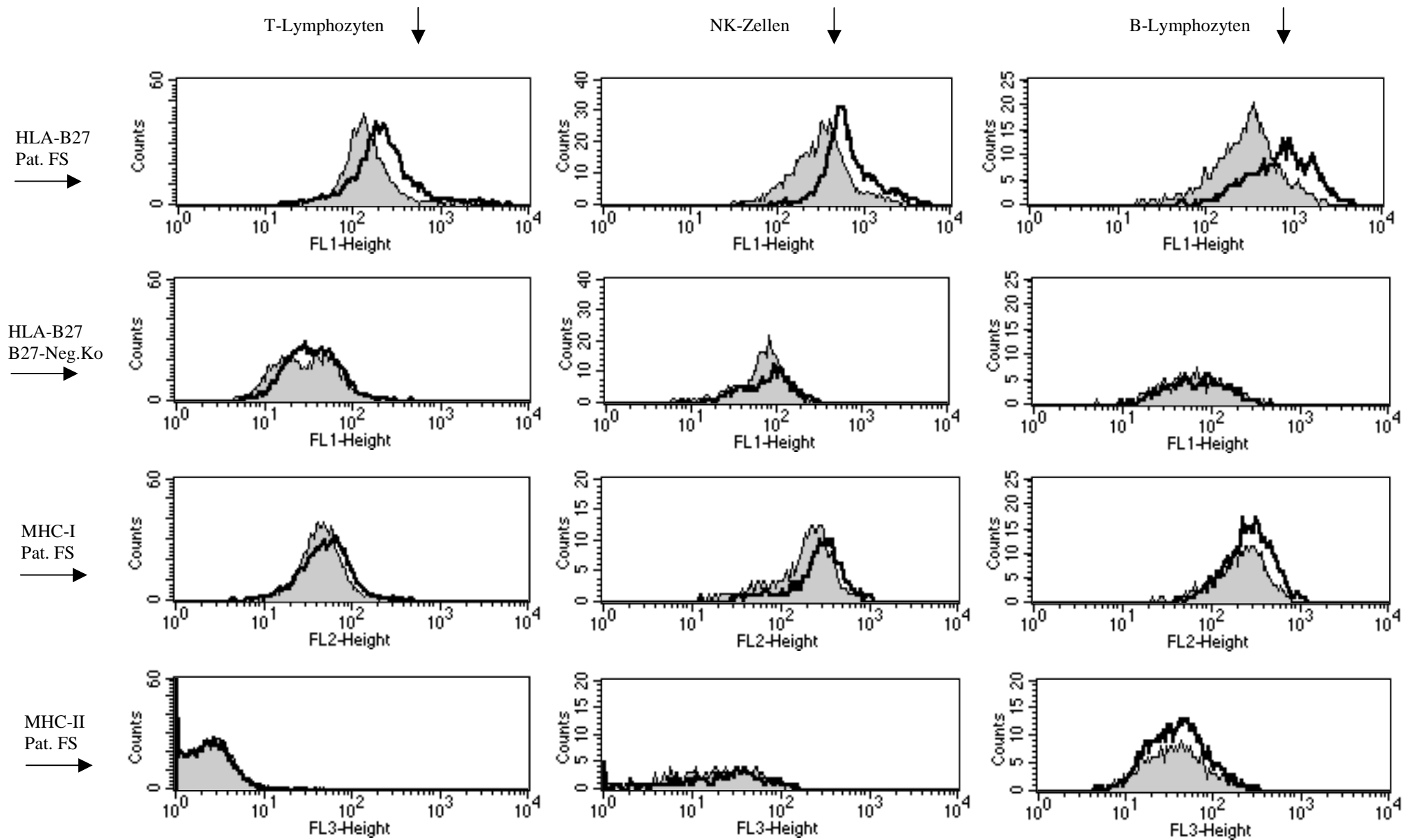
**Abb. 16:** Grafische Darstellung der einfachen linearen Regression zwischen der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression der Patientengruppe am Beispiel des FD705-AK.  
Es besteht keine signifikante Korrelation. (Signifikante Korrelation wird angenommen bei  $(r) \geq 0,8$ ).

### **III.3.3. MHC-Klasse-II-Oberflächenexpression**

Die MHC-Klasse-II-Expression blieb sowohl in der Patienten-, als auch in den Kontrollgruppen mit folgenden Ausnahmen über den gesamten Beobachtungszeitraum stabil:

Ein Patient zeigte auf den NK-Zellen eine 1,8fache, ein anderer auf den B-Lymphozyten eine 1,7fache Zunahme der MHC-Klasse-II-Expression. Bei einem weiteren Patienten fiel die Expression der NK-Zellen auf die Hälfte ab.

Bei den HLA-B27-Negativkontrollen war in einem Fall auf den NK-Zellen ein 1,7facher, in einem anderen auf den B-Lymphozyten ein 1,6facher Anstieg der Oberflächenexpression nachweisbar. Alle anderen Werte blieben sowohl in der HLA-B27-Negativ-, als auch in der HLA-B27-Positivkontrollgruppe im wesentlichen unbeeinflusst.



**Abb. 17:** Histogramm overlay. Zunahme der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression (Reihe 1 und 3), erkennbar an der Rechtsverschiebung der Histogramme. Unveränderte MHC-Klasse-II-Expression (Reihe 4) und unveränderte HLA-B27-Expression der HLA-B27-Negativkontrolle (Reihe 2). Werte von Pat. FS und zugehöriger HLA-B27-Negativkontrolle. Ausgefülltes Histogramm = vor Therapie, leeres Histogramm = Woche 48 (Patient) bzw. Woche 50 (Negativkontrolle). Verwendeter HLA-B27-AK: FD705.

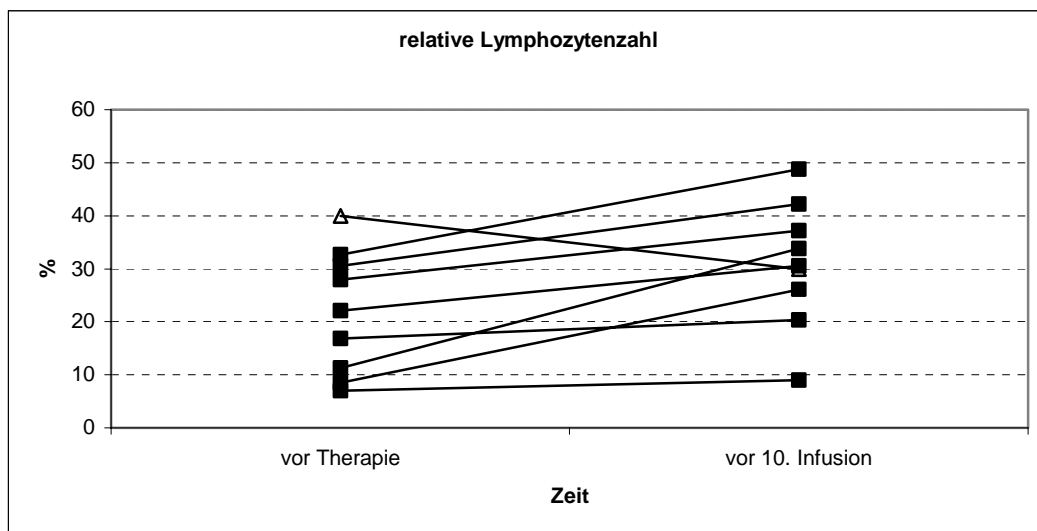
### III.3.4. Quadrantenanalyse

Die Quadrantenanalyse der erhobenen durchflusszytometrischen Daten zeigte bei 7 der 8 Therapieresponder einen Anstieg der relativen Lymphozytenzahl unter Infliximab (vgl. Abb. 18a). Bei 4 dieser Patienten war zudem ein Anstieg der absoluten Lymphozytenzahl zu beobachten.

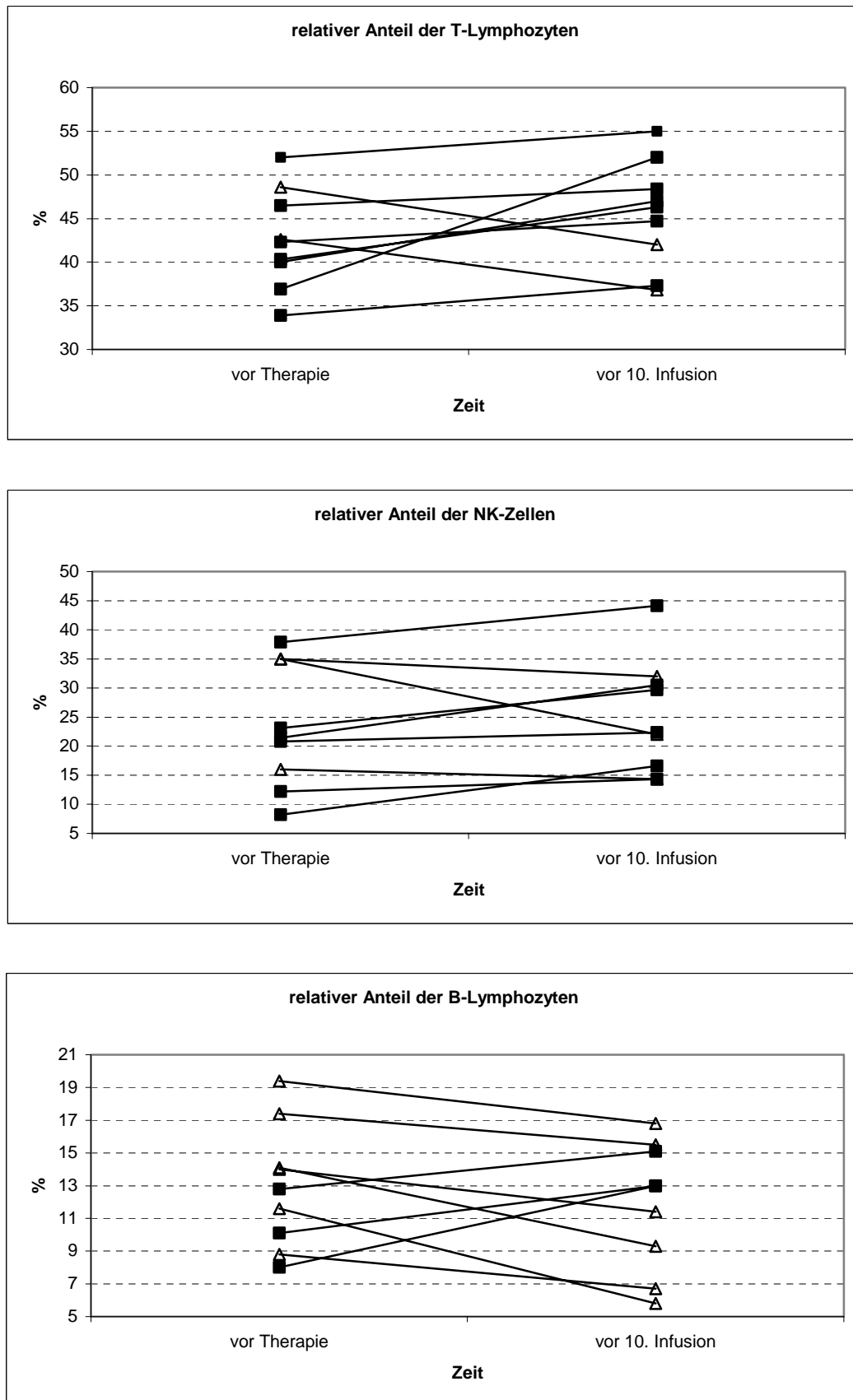
Die separate Analyse der Subpopulationen ergab in über 50% der Fälle eine Zunahme des relativen T-Lymphozytenanteils (6/8 Therapieresponder) und des NK-Zellanteils (6/8 Therapieresponder) und eine Abnahme des B-Lymphozytenanteils (5/8 Therapieresponder) (vgl. Abb. 18b).

Bei Pat. BB (Studienabbruch) fiel der relative Lymphozytenanteil nach passagerem Anstieg in Woche 18 wieder ab. Bei Pat. HT (sekundärer Therapieversager) persistierte während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine Neutrophilie mit absoluter Lymphopenie.

In der Kontrollgruppe waren keine quantitativen Veränderungen bei den Lymphozytensubpopulationen zu beobachten.



**Abb. 18a:** Quadrantenanalyse der Therapieresponder: Anstieg der relativen Lymphozytenzahl unter Infliximab. Verglichen sind die Werte vor Therapie und vor der 10. Infusion. (Zur besseren Veranschaulichung ist die Zunahme mit gefüllten, die Abnahme mit leeren Symbolen dargestellt).



**Abb. 18b:** Separate Aufführung der einzelnen Lymphozytensubpopulationen: Zunahme des relativen T-Lymphozyten- und NK-Zell-Anteils und Abnahme des relativen B-Lymphozytenanteils unter Infliximab.



## **IV. DISKUSSION**

### **IV.1. DISKUSSION DER KLINISCHEN ERGEBNISSE**

Im klinischen Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit Infliximab zu einer deutlichen und anhaltenden Verbesserung der Krankheitsaktivität bei aktiver AS führt. 8 der 10 eingeschlossenen Patienten erreichten die zugrunde gelegten Zielkriterien. Die Verbesserung der Aktivitätsparameter ging einher mit der Normalisierung der laborchemischen Entzündungswerte und kernspintomografischen Befunde. Innerhalb der Placebogruppe blieb die Krankheitsaktivität während der zweiarmigen Phase konstant, unabhängig von einer Behandlung mit NSAR.

Aufgrund der niedrigen Fallzahl ist die statistische Aussagekraft dieser Ergebnisse und die Beurteilung der Signifikanz beschränkt. Die vorgelegten Daten werden jedoch gestützt durch die Zwischenauswertung der TNF-AS-2-Studie (Braun *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2002), in die 7 der im Rahmen dieser Arbeit behandelten Patienten eingegangen sind, sowie durch weitere Langzeitergebnisse mit Infliximab (Kruithof *et al.*, 2002; Breban *et al.*, 2002; Maksymowych *et al.*, 2002b; Van den Bosch *et al.*, 2002; Temekonidis *et al.* 2003).

#### **IV.1.1. Beurteilung der Therapiewirksamkeit von Infliximab bei Patienten mit aktiver Spondylitis ankylosans**

Im Gegensatz zur RA existieren für die AS keine validen laborchemischen Aktivitätsparameter. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Höhe der Entzündungsparameter nicht immer mit der Krankheitsaktivität korreliert (Laurent & Panayi, 1983; Sheehan *et al.*, 1986; Spoorenberg *et al.*, 1999). Hohe Entzündungswerte müssen nicht in jedem Fall mit einer subjektiven Verschlechterung oder mit bildgebenden Veränderungen einhergehen (Khan *et al.*, 1985; van der Linden *et al.*, 1988), umgekehrt muss sich ein „Schub“ nicht notwendigerweise in einer Erhöhung der klassischen Laborparameter niederschlagen. Dies ist auch der Grund, weshalb bei der TNF-AS-2-Studie laborchemische Parameter nicht als Einschlusskriterium herangezogen wurden.

Wie in III.2.2. dargelegt, sinken CRP und BKS bereits nach einer Veruminfusion in den Normbereich ab. Bei Patienten mit RA konnte gezeigt werden, dass die durch eine TNF-Blockade induzierte Normalisierung der Entzündungsparameter mit einer Verlangsamung der radiologischen Progression assoziiert ist (Lipsky *et al.*, 2000). Interessant ist, dass bei der AS eine Therapie mit NSAR keinen oder nur geringen Effekt auf BKS und CRP hat und vermutlich keinen Einfluss auf die Krankheitsprogression nimmt (Dougados & van der Heijde, 2002). Es ist denkbar, dass bei der AS der Verlauf der Entzündungswerte eher mit der Krankheitsprogression als mit der punktuellen Krankheitsaktivität korreliert. Zumindest bei isoliert axialem Befallsmuster gibt es Hinweise dafür, dass hohe CRP-Werte mit einem raschen Fortschreiten der Erkrankung assoziiert sind (Averns *et al.*,

1996; Dougados *et al.*, 1999). Es bleibt zu prüfen, ob die durch Infliximab induzierte Suppression der Akute-Phase-Proteine die Krankheitsprogression der AS beeinflusst oder lediglich als Epiphänomen zu werten ist. Wäre ersteres der Fall, stünde mit TNF-Antikörpern bei der Therapie der AS eine Substanzklasse zur Verfügung, mit der neben einer effektiven Entzündungshemmung erstmals eine Prognoseverbesserung erreicht werden könnte.

Für eine therapeutische Überlegenheit von Infliximab spricht auch die Verbesserung der unter NSAR-Gabe unveränderten kernspintomografischen Befunde (vgl. III.2.3.). Entzündliche Veränderungen im Rahmen einer akuten Sakroiliitis und Spondylitis führen nach Gadolinium-Applikation in der fettunterdrückten (STIR-) Sequenz zur Signalverstärkung und können so in einer sehr frühen Phase mittels kernspintomografischer Aufnahmen detektiert werden (Braun *et al.*, 1994; Bollow *et al.*, 1995; Bollow *et al.*, 2002). Stone *et al.* konnten zeigen, dass der klinische Therapieerfolg unter Infliximab mit der Verbesserung des bildgebenden Befundes korreliert (Stone *et al.*, 2001). Vergleichbare Ergebnisse existieren bei der Therapie von Enthesiopathien mit Etanercept (Marzo-Ortega *et al.*, 2001). Auf diesem Hintergrund ist der beschriebene Rückgang der Kontrastmittelanreicherung in Woche 14 und 60 als Ausdruck einer wirksamen Entzündungseindämmung unter TNF-Blockade zu werten. Da der Ossifikationsprozess der AS mitunter über chronische Entzündungsprozesse getriggert zu sein scheint (vgl. I.1.3.), könnte der Blockade lokaler Entzündungsvorgänge eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung irreversibler Ankylosierungen zukommen.

Die Beurteilung sowohl der Krankheitsaktivität als auch der Therapiewirksamkeit erfolgte anhand des BASDAI. Dieser fußt nach dem Prinzip der visuellen Analogskala auf der Selbsteinschätzung des Patienten und unterliegt daher persönlichen Variablen und mitunter auch der Suggestibilität der betreffenden Person (vgl. VIII.1.1.). Nichtsdestotrotz ist der BASDAI als das derzeit valideste Instrument für die Aktivitätsbeurteilung der AS anzusehen (Calin *et al.*, 1999c; Haywood *et al.*, 2002). Objektivere Parameter, wie die Messung der funktionellen Bewegungseinschränkungen durch den BASMI, haben sich als weniger sensitiv herausgestellt (Anderson *et al.*, 2001). Dies könnte damit zusammenhängen, dass in fortgeschrittenen Krankheitsstadien durch die bereits bestehende Ankylosierung keine Verbesserung der Beweglichkeit mehr zu erwarten ist.

Die mangelnde Verfügbarkeit objektiver Parameter, insbesondere laborchemischer Entzündungszeichen, stellt sicherlich ein Problem bei der Aktivitätsbeurteilung der AS dar. Dies könnte die Bewertung der Therapiewirksamkeit beeinflussen und ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten.

#### **IV.1.2. Beurteilung der Sicherheit und Verträglichkeit von Infliximab bei Patienten mit aktiver Spondylitis ankylosans**

Das zu erwartende Nebenwirkungsprofil einer anti-TNF-Therapie lässt sich hypothetisch ableiten aus der Suppression TNF-vermittelter Wirkungen einerseits und aus der chemisch-immunologischen Natur des jeweiligen TNF-Blockers andererseits. Da eine TNF-Blockade immunsupprimierend wirkt, ist mit einer erhöhten Infektanfälligkeit zu rechnen. Die komplexe Einflussnahme von TNF auf das Überleben von Zellen, insbesondere die Fähigkeit zur Tumorkontrolle, lassen außerdem an ein erhöhtes Malignomrisiko unter anti-TNF-Therapie denken. Vorwiegend bei der Gabe eines chimären AK sind infolge der Immunogenität nicht humaner Anteile allergische Reaktionen und Autoimmunphänomene denkbar (z.B. Induktion von AK gegen den therapeutischen AK, sogenannte HACA = human anti chimeric antibodies).

Die in III.2.4. beschriebenen passageren Nebenwirkungen decken sich mit den bisher hierzu veröffentlichten Daten. In den bisher größten placebokontrollierten Studien mit Infliximab (Schaible, 2000) zeigten sich als häufigste Nebenwirkungen ebenfalls unspezifische infusionsassoziierte Reaktionen, wie Kopfschmerzen, Müdigkeit und Infektionen des oberen Respirationstraktes.

In der vorliegenden Untersuchung hatten alle Patienten einen negativen Tuberkulintest und zeigten unter TNF-Blockade keine Hinweise auf eine Tuberkulose. Mit der zunehmenden Verabreichung von TNF-Blockern kristallisiert sich jedoch v.a. bei Infliximab eine starke, bisher allerdings statistisch nicht belegte Assoziation mit Tuberkulosereaktivierungen heraus. Bis Mai 2001 wurden weltweit 147.000 Patienten mit Infliximab und 102.000 Patienten mit Etanercept therapiert. Unter Infliximab sind 70, unter Etanercept 9 Fälle einer reaktivierten Tuberkulose dokumentiert (Keane *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich in über 50 % um extrapulmonale oder disseminierte Formen, die im allgemeinen nur unter extremer Immunsuppression, beispielsweise im Rahmen einer HIV-Infektion, beobachtet werden. In vitro und an Mausmodellen wurde ein Zusammenhang zwischen Tuberkuloseanfälligkeit und verminderter TNF-Aktivität gezeigt (Keane *et al.*, 2000; Mohan *et al.*, 2001). Es ist denkbar, dass TNF bei der Abwehr und Kontrolle von Mykobakterien eine besondere Rolle spielt. Unklar ist allerdings, warum eine TNF-Blockade durch Etanercept mit einem geringeren Reaktivierungsrisiko einher zu gehen scheint.

Ein Patient (BB) entwickelte im Anschluss an einen Thailandaufenthalt eine Hepatitis unklarer Genese. Bisher sind 2 Fälle einer bioptisch gesicherten cholestatischen Hepatitis unter Infliximab beschrieben (Saleem *et al.*, 2001; Menghini & Arora, 2001). Im vorliegenden Fall erscheint eine medikamentös-toxische Ursache jedoch unwahrscheinlich, da unter Fortführung der Infliximabtherapie eine Normalisierung der Transaminasen zu beobachten war.

Als auffällig häufig ist in der vorliegenden Studie der Anstieg des ANA-Titers anzusehen, der in einem Fall mit der Entwicklung eines Lupus-like-Syndroms assoziiert war. Eine Induktion von ANA unter TNF-Blockade ist in der Literatur regelmäßig beschrieben (Sandborn & Hanauer, 1999; De Rycke *et al.*, 2003; Debandt *et al.*, 2003). Eine gleichzeitige Therapie mit MTX scheint die therapieinduzierte Bildung von AK zu verringern, vermutlich durch die dadurch mögliche Dosisreduktion des TNF-Blockers (Lipsky *et al.*, 2000). Die pathologische Bedeutung der ANA-Bildung ist nicht geklärt. Es konnte bisher weder eine signifikante Korrelation mit einem Wirkungsverlust, noch mit einem gehäuftem Auftreten von Nebenwirkungen nachgewiesen werden. Ein medikamentös induziertes Lupus-like-syndrome, für das ein Anstieg des ANA-Titers charakteristisch ist, insbesondere beim Nachweis von Doppelstrang-DNS-AK und Histon-AK, ist im Rahmen der oben erwähnten Studien in weniger als 1% dokumentiert. Hinzu kommt, dass die Häufigkeit der nachgewiesenen Doppelstrang-DNS-AK von der verwendeten Bestimmungsmethode abhängt (Charles *et al.*, 2000). Beim derzeitigen Wissensstand muss eine ANA-Induktion unter TNF-Therapie ohne Vorliegen klinischer lupus-typischer Symptome daher als zu beobachtendes Begleitphänomen gewertet werden.

Eine potentielle Zunahme der Malignominzidenz kann aufgrund der geringen Fallzahlen und kurzen Beobachtungszeiträume weder in der vorliegenden Arbeit, noch anhand der bisherigen Studien beurteilt werden.

#### **IV.1.3. TNF und Spondylitis ankylosans**

In der Pathogenese der RA scheinen TNF und IL-1 eine primäre Rolle zu spielen (Choy & Panayi, 2001; Feldmann *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit der AS existieren inzwischen ebenfalls Hinweise, die eine primäre Beteiligung TNF-vermittelter Effekte bei der Krankheitsmanifestation vermuten lassen. So konnte aus den ISG von AS-Patienten TNF-mRNA und TNF-Protein (Braun *et al.*, 1995) isoliert werden. In Studien wurde die Wirksamkeit einer TNF-Blockade nicht nur bei AS, sondern auch bei Crohn-Arthritis und Psoriasis-Arthritis gezeigt (Van den Bosch *et al.*, 2000b; Van den Bosch *et al.*, 2000a; Van Den Bosch *et al.*, 2002; Mease *et al.*, 2000). Dies ist unter zwei Gesichtspunkten erwähnenswert. Zum einen handelt es sich bei diesen Arthritisformen wie bei der AS um Erkrankungen aus dem Formenkreis der SpA. Zum anderen können bei 20 - 60% der SpA-Patienten Darmläsionen diagnostiziert werden, die mit den Schleimhautveränderungen im Rahmen eines Morbus Crohn vergleichbar sind (Mielants *et al.*, 1996; Vaile *et al.*, 1999; De Keyser *et al.*, 2000).

Es stellt sich die Frage, ob die eindruckliche therapeutische Wirksamkeit einer TNF-Blockade lediglich Ausdruck einer unspezifischen Immunsuppression ist, oder auf eine zentrale Rolle von TNF

in der Pathogenese der AS zurückzuführen ist. Gestützt auf die oben aufgeführten klinischen und histologischen Befunde ist bei der AS die Möglichkeit einer pathologisch erhöhten TNF-Expression zu diskutieren. Tatsächlich konnten bei AS-Patienten mittels ELISA signifikant höhere TNF- und IL6-Serumspiegel nachgewiesen werden (Gratacos *et al.*, 1994; Schotte H, 2001). Im Tiermodell scheint eine Überexpression von TNF die Manifestation AS-ähnlicher Läsionen ebenfalls zu begünstigen (Crew *et al.*, 1998). Dagegen zeigten Rudwaleit *et al.* in durchflusszytometrischen Untersuchungen eine niedrigere TNF-Produktion von T-Zellen bei AS-Patienten und HLA-B27-positiven gesunden Personen verglichen mit HLA-B27-negativen Kontrollpersonen (Rudwaleit *et al.*, 2001). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass die TNF-Expression in den Kompartimenten Blut und Gewebe nicht notwendigerweise miteinander korrelieren müssen und eine niedrige periphere TNF-Produktion eine hohe lokale TNF-Exposition nicht ausschließt (Colbert *et al.*, 2001). Bei Patienten mit RA konnten in Synovia und Synovialis befallener Gelenke signifikant erhöhte TNF-Spiegel nachgewiesen werden, was für die Möglichkeit einer Kompartimentierung der TNF-Expression spricht (Husby & Williams, 1988; Tetta *et al.*, 1990; Chu *et al.*, 1991).

Ausgehend von den in I.3.1. beschriebenen immunologischen Zytokineffekten ist es denkbar, dass TNF-vermittelte Umbauvorgänge in Gelenken und gelenknahen Strukturen bei der Pathogenese der AS beteiligt sind. So könnte eine TNF-induzierte Überexpression von Adhäsionsmolekülen die Migration und Rekrutierung von Entzündungszellen in Gelenken begünstigen, was eine Änderung des intraartikulären Zytokinprofils zur Folge hätte (Vaday & Lider, 2000). Dadurch induzierte und durch TNF unterhaltene Mechanismen könnten langfristig zu Remodelingvorgängen und schließlich zur Ankylosierung führen. Zu denken ist hierbei v.a. an TNF-abhängige Effekte, wie Ausschüttung degradierender Enzyme (Saklatvala, 1986; Van den Berg, 1999), Fibroblastenproliferation (Kim *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001), Osteoklastenaktivierung (Gravallese *et al.*, 2000; Romas *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2002) und Einwanderung von Osteoklastenvorstufen (McGowan *et al.*, 2001) oder T-Zell-vermittelten Knochenabbau (Kong *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass TNF durch Vermittlung immunsupprimierender Effekte, wie die Limitierung der T-Zell-Antwort oder die Induktion antiinflammatorischer Zytokine, zur Entwicklung einer latenten protrahiert verlaufenden Entzündungsreaktion beiträgt und damit eine Chronifizierung des Entzündungsgeschehens bahnt (Cope *et al.*, 1997; Ruuls & Sedgwick, 1999; Maini, 2000).

Wie in der Einleitung dargelegt, wird neben TNF seit langem HLA-B27 als zentraler pathogenetischer Faktor der AS diskutiert. Nach den vorangegangenen grundsätzlichen Überlegungen zur pathogenetischen Rolle TNF-vermittelter Effekte wird nun im Folgenden unter dem Aspekt der therapeutischen TNF-Blockade auf eine mögliche Assoziation zwischen TNF und HLA-B27 fokussiert.

## **IV.2. DISKUSSION DER EXPERIMENTELLEN ERGEBNISSE**

### **IV.2.1. Validität der Ergebnisse**

Während punktuelle Analysen der HLA-B27-Expression seit den 70er Jahren durchgeführt werden, liegen längerfristige durchflusszytometrische Verlaufsbeobachtungen unter Therapiebedingungen bisher noch nicht vor. Die Absolutwerte der Fluoreszenz (FL) bei durchflusszytometrischen Untersuchungen hängen von vielen Faktoren ab, wie z.B. HLA-B27-Subtyp, AK-Menge, AK-Hersteller, Durchflusszytometriegerät, und sind deshalb nur bedingt vergleichbar (z.B. Kirveskari *et al.*, 1999; el-Zaatari & Taurog, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Messwerte können daher nicht ohne weiteres mit den in der Literatur verfügbaren FL-Werten in Beziehung gesetzt werden. Für die Untersuchung einer potentiellen Beeinflussung der HLA-B27-Expression durch eine Anti-TNF-Therapie ist daher eine intraindividuelle Verlaufsbeobachtung unter möglichst stabilen Bedingungen geeignet. Es wurde deshalb mit der Zellkryokonservierung eine Methode gewählt, die es erlaubt, die zu den verschiedenen Visiten gewonnen Zellen eines Patienten zum gleichen Zeitpunkt zu analysieren.

Es ist bekannt, dass die Oberflächenexpression von HLA-Antigenen temperaturabhängig ist. Fiebig *et al.* konnten an Lymphozyten jedoch zeigen, dass die Zellkryokonservierung mit DMSO keinen signifikanten Einfluss auf durchflusszytometrische Analysen bedingt und vergleichbare Ergebnisse zu Frischzellanalysen liefert (Fiebig *et al.*, 1997). Unsere Analysen wurden sowohl in einer Zwischenauswertung in Woche 24 (Wittwer *et al.*, 2001), als auch mit erweitertem AK-Spektrum in einer Endauswertung nach Woche 60 durchgeführt. Die dabei erhobenen redundanten Bestimmungen zeigten eine gute Übereinstimmung. Um den Einfluss methodischer Fehler durch den Einfrier- oder Auftauvorgang der Lymphozyten auszuschließen, wurden die Proben bei der Endauswertung teilweise in umgekehrter Reihenfolge aufgetaut und analysiert. Ferner wurden stichprobenartig bei einzelnen Visiten parallel Daten aus frischen ficollierten Lymphozyten erhoben und mit den Daten der akquirierten Zellen verglichen.

In Übereinstimmung mit Fiebig *et al.* zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, so dass eine durch die Zellaufbereitung bedingte Veränderung der HLA-Oberflächenexpression unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus zeigen die stabilen Messwerte innerhalb der HLA-B27-negativen Kontrollpersonengruppe, dass eine Expressionszunahme aufgrund unspezifischer, beispielsweise methodisch bedingter, AK-Bindung, nicht anzunehmen ist.

#### **IV.2.2. Zunahme der Oberflächenexpression von HLA-B27- bzw. MHC-Klasse-I-Molekülen auf Lymphozyten durch wiederholte Therapie mit Infliximab**

In der durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten konnte bei der Patientengruppe eine Zunahme der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression gezeigt werden, während die MHC-Klasse-II-Expression unverändert blieb. Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen den Verläufen der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression. Der Expressionsanstieg konnte auf den einzelnen Lymphozytensubpopulationen in unterschiedlicher Ausprägung nachgewiesen werden. Bei den HLA-B27-positiven und -negativen Kontrollpersonen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Expression der jeweiligen Oberflächenantigene. Die Quadrantenanalyse ergab bei den Therapierespondern (8/10) eine relative Zunahme der T-Lymphozyten und NK-Zellen und eine relative Abnahme der B-Lymphozyten unter Infliximab. Bei 4 dieser Patienten war zudem ein Anstieg der absoluten Lymphozytenzahl zu beobachten.

Ein Patient (BB) ist in Woche 36 unter dem Verdacht eines medikamentös induzierten Lupus-like-Syndroms aus der Studie ausgeschieden. Zuvor war bei ihm außerdem eine Hepatitis unklarer Genese aufgefallen. Interessanterweise fiel bei ihm die HLA-B27-Expression unter Infliximabgabe nach initialer Zunahme in Woche 18 wieder ab. Ebenso sank der relative Lymphozytenanteil nach passagerem Anstieg in Woche 18 wieder ab. Ob diese Befunde mit der Entwicklung des Lupus-like-Syndroms oder der Hepatitis assoziiert sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Die ausbleibende definitive Zunahme der HLA-B27-Expression könnte jedoch für einen Zusammenhang zwischen Therapieerfolg und ansteigender HLA-B27-Expression sprechen. Hier muss allerdings eingeräumt werden, dass auch bei Pat. HT trotz sekundären klinischen Therapieversagens ein Anstieg der HLA-B27-Expression zu beobachten war. Bemerkenswert ist, dass bei ihm während des gesamten Beobachtungszeitraums eine absolute Lymphopenie persistierte. Da insgesamt nur 2 Patienten von einem Therapieversagen betroffen waren, kann die Relevanz dieser Phänomene jedoch nicht beurteilt werden.

Da HLA-B27 als MHC-Klasse-I-Molekül durch den MHC-Klasse-I-spezifischen AK w6/32 detektiert wird, ist bei Zunahme der HLA-B27-Expression auch eine Zunahme der MHC-Klasse-I-Expression zu erwarten. Die fehlende Korrelation zwischen den Verläufen der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression könnte dadurch bedingt sein, dass sich die Effekte der Expressionszunahme und der beobachteten intraindividuellen Schwankungen der MHC-Klasse-I-Expression überlagern (vgl. III.3.2). Andererseits könnte die Diskrepanz zwischen beiden Expressionsverläufen jedoch auch darauf hinweisen, dass HLA-B27 unter bestimmten Umständen ein von anderen MHC-Klasse-I-Molekülen abweichendes Verhalten zeigt, was im weiteren Verlauf noch diskutiert werden wird.

Obwohl die statistischen Auswertungen aufgrund der niedrigen Fallzahl nur eingeschränkt aussagekräftig sind, sprechen die Daten für einen Zusammenhang zwischen der anti-TNF-Therapie und der ansteigenden HLA-B27-Expression. Die Tatsache, dass der Beginn der erfassbaren klinischen Verbesserung nicht mit dem Einsetzen der Expressionszunahme korreliert, schließt eine mögliche Assoziation beider Befunde nicht aus. So konnte beispielsweise bei mit Infliximab therapierten AS-Patienten gezeigt werden, dass die therapieinduzierten Veränderungen der zellulären Zytokinexpression und der Beginn des klinischen Therapieerfolgs zeitlich nicht miteinander korrelieren (Zou *et al.*, 2003).

Für die gezeigte Zunahme der HLA-B27-Oberflächenexpression unter Infliximab sind zwei verschiedene Mechanismen zu diskutieren:

1. die veränderte Kompartimentierung HLA-B27-hochexprimierender Zellen
2. die Hochregulation der HLA-B27-Expression.

#### 1. Veränderte Zellkompartimentierung unter Infliximab

Wie in I.3.1. dargelegt, beeinflusst TNF über das Zusammenspiel komplexer Mechanismen Zellmigration und Apoptose. Es ist daher vorstellbar, dass die Verabreichung TNF-blockierender Substanzen qualitative und quantitative Veränderungen innerhalb des intra- und extravasalen Kompartiments zur Folge hat.

Unter TNF-Blockade ist sowohl die Hemmung (Wallach *et al.*, 1999; Miki & Eddy, 2002), als auch die Aktivierung (Van Antwerp *et al.*, 1996; Beg & Baltimore, 1996) TNF-abhängiger Apoptosesignalkaskaden denkbar. Die unter TNF-Suppression beobachtete Endothelaktivierung (Paleolog *et al.*, 1996; Tak *et al.*, 1996; Baeten *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001) könnte zudem eine intravasale Retention von T-Lymphozyten (Ohshima *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2001) und eine Einwanderung von B-Lymphozyten in die Synovia (Baeten *et al.*, 2001) induzieren. Derartige Effekte könnten schließlich zur intravasalen Kompartimentierung höher exprimierender Zellen und damit zum beobachteten Anstieg der HLA-B27-Expression führen. Da TNF außerdem einen potenten B-Zell-Wachstumsfaktor darstellt (Boussiotis *et al.*, 1994), ist bei der gemessenen Abnahme der B-Lymphozytenfraktion unter Infliximab möglicherweise auch eine Hemmung der Zellreifung beteiligt, was zur Erniedrigung HLA-B27-schwachexprimierender Zellen führen könnte.

#### 2. Hochregulation der HLA-B27-Expression unter Infliximab

MHC-Klasse-I-Moleküle sind im Normalfall trimolekulare Komplexe, bestehend aus schweren Ketten (HC),  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) und präsentiertem Peptid. Sie werden als membranständige



Glykoproteine auf den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert. Dieser trimolekulare Komplex wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und tritt physiologischerweise erst in Anwesenheit des antigenen Peptids zusammen (Pamer & Cresswell, 1998), um dann über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche zu gelangen. Zu einem kleineren Teil werden MHC-Klasse-I-Moleküle jedoch auch in Form  $\beta_2m$ -freier HC exprimiert. Derartige Varianten entstehen nach fehlerhafter Prozessierung möglicherweise durch eine  $\beta_2m$ -Dissoziation an der Zelloberfläche (Rock *et al.*, 1991). In jüngster Zeit wird die fehlerhafte Prozessierung des HLA-B27-Moleküls bei der Pathogenese HLA-B27-assoziiierter Erkrankungen diskutiert. Es wird postuliert, dass dabei entstehende aberrante B27-HC in  $\beta_2m$ -freier Form exprimiert werden (Khare *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2002; Uchanska-Ziegler & Ziegler, 2003) oder als retinierte B27-Moleküle im ER akkumulieren und auf diese Weise eine Entzündungsreaktion triggern (Mear *et al.*, 1999; Colbert, 2000).

Wie in IV.1.3. dargelegt, wird bei der Pathogenese der AS die Möglichkeit einer TNF-Überproduktion diskutiert. Da TNF die Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen induziert (Gobin *et al.*, 1998; Girdlestone, 2000; Hallermalm *et al.*, 2001), ist es denkbar, dass eine erhöhte TNF-Exposition einen gesteigerten intrazellulären Umsatz schwerer Ketten und dadurch die Akkumulation oder Oberflächenexpression fehlerhafter B27-HC begünstigt. Es ist somit umgekehrt vorstellbar, dass die Therapie mit Infliximab durch Blockierung der TNF-induzierten HLA-Biosynthese die Entstehung fehlerhafter B27-HC hemmt. Nach wiederholter Applikation könnte auf diese Weise die Reexpression trimolekularer HLA-B27-Komplexe gefördert werden, was die Bindung konformationsabhängiger AK begünstigen würde.

Für die Bindung von ME1, dessen HLA-B27-Epitop identifiziert werden konnte, ist die Anwesenheit eines  $\beta_2m$ -Moleküls erforderlich (Benjamin & Parham, 1990; el-Zaatari *et al.*, 1990; el-Zaatari & Taurog, 1992), so dass die Expression  $\beta_2m$ -loser HC eine verminderte Me1-Bindung zur Folge hätte. Diese Konformationsabhängigkeit der AK-Bindung wäre vereinbar mit der Hypothese, dass die vor Therapiebeginn niedrigere HLA-B27-FL durch retinierte, nicht an der Zelloberfläche exprimierte oder durch exprimierte,  $\beta_2m$ -lose B27-HC verursacht sein könnte.

Das Epitop des monomorphen MHC-Klasse-I-AK w6/32 ist nicht exakt bekannt, höchstwahrscheinlich liegt es auf der  $\alpha 2$ -Domäne der MHC-Klasse-I-Moleküle und kann vermutlich wie der HLA-B27-AK Me1 nur in Verbindung mit  $\beta_2m$  erkannt werden (Barnstable *et al.*, 1978; el-Zaatari *et al.*, 1990; Kapasi & Inman, 1994; Malik *et al.*, 1999). Eine herabgesetzte HLA-B27-Oberflächenexpression oder  $\beta_2m$ -freie HLA-B27-Moleküle könnten somit auch eine verminderte w6/32-FL-Intensität bedingen. Der gemessene Anstieg der HLA-B27-Expression unter Infliximab wäre somit Ausdruck einer veränderten intrazellulären Prozessierung von HLA-B27-Molekülen mit konsekutiver Mehrexpression AK-kompatibler HLA-B27-Oberflächenantigene.

Als MHC-Klasse-I-Molekül interagiert HLA-B27 mit cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL oder CD8<sup>+</sup>-Zellen). Seine biologische Funktion besteht darin, dem T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptide zu präsentieren, die aus der Prozessierung intrazellulärer Proteine stammen. Derartige Peptide sind entweder körpereigen und weisen im Komplex mit HC und  $\beta_2m$  die betreffende Zelle als „Selbst“ aus, oder sie stammen von invasiven intrazellulären Erregern. In diesem Fall wird die Zelle als infiziert identifiziert und zerstört.

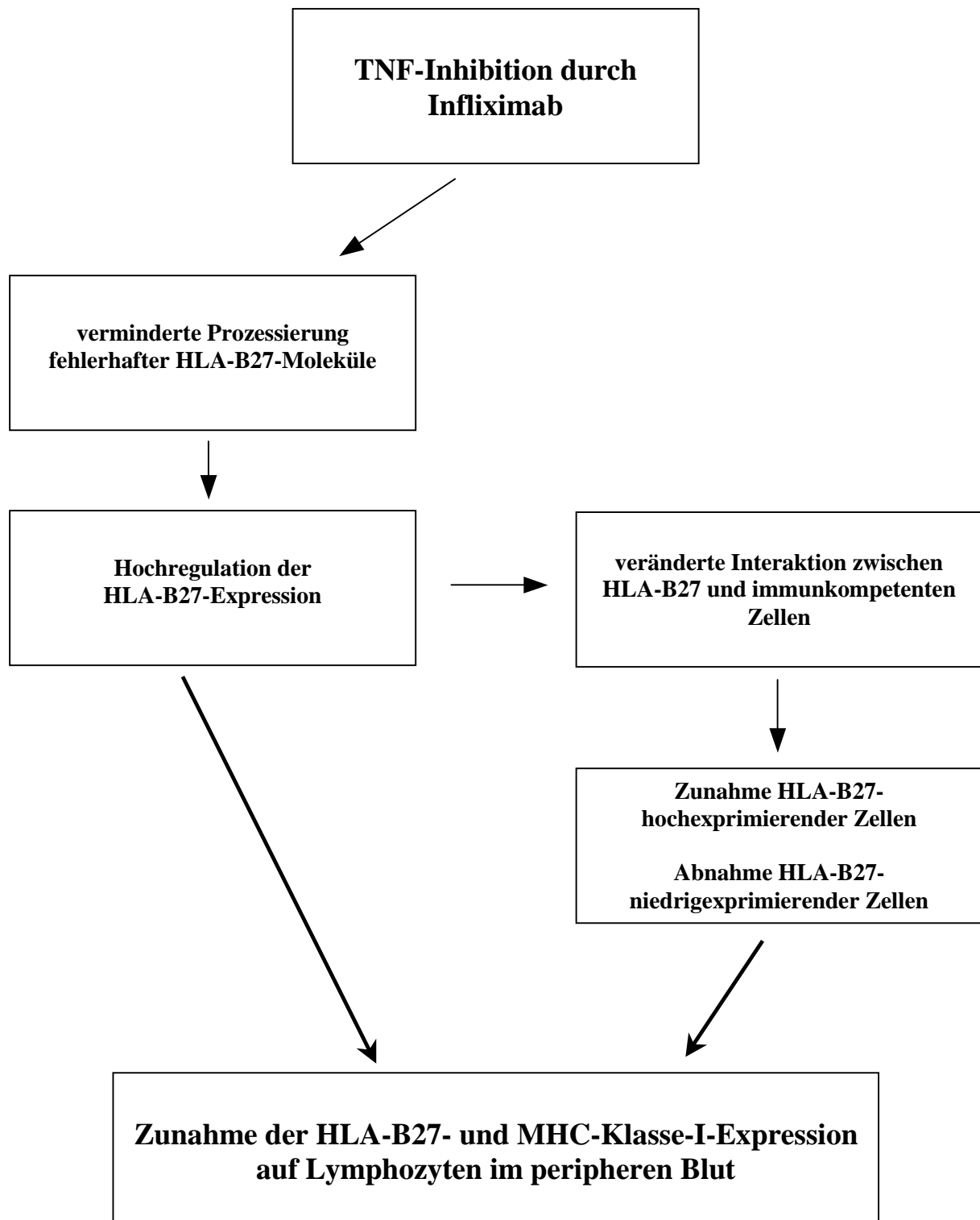
Im Gegensatz zu anderen  $\beta_2m$ -freien MHC-Homodimeren, die sich im Normalfall funktionell inaktiv verhalten (Rock *et al.*, 1991), sind  $\beta_2m$ -freie Varianten von HLA-B\*2705 in der Lage, Peptide in einer ungewöhnlich stabilen Form zu binden (Malik *et al.*, 2002). Zudem wird bei der Dimerisierung aberranter HC-B27 das für das Antigenbindungsverhalten wichtige Cystein<sup>67</sup> (Alvarez *et al.*, 2001; Reinelt *et al.*, 2001; Dangoria *et al.*, 2002) durch Disulfidbrückenbildung modifiziert (Allen *et al.*, 1999). Es ist daher möglich, dass  $\beta_2m$ -freie HC-B27 andere Peptidbindungseigenschaften aufweisen als trimolekulare B27-Moleküle. Dies wäre vereinbar mit Befunden, nach denen HLA-B27 unter bestimmten Umständen eine ungewöhnliche, von anderen Klasse-I-Molekülen abweichende, Antigenbeladung zu zeigen scheint (Benjamin *et al.*, 1991; Garcia *et al.*, 1997; Urban *et al.*, 1994; Boisgerault *et al.*, 1998; Peh *et al.*, 1998). Peptidbeladene  $\beta_2m$ -freie B27-Moleküle könnten daher als Neoantigene die Lyse durch B27-restringierte CTL triggern. Ungewöhnlicherweise werden B27-HC unter bestimmten Umständen zudem von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten erkannt (Khare *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2001; Boyle & Hill Gaston, 2003) wodurch eine CD4<sup>+</sup>-vermittelte Immunantwort getriggert werden könnte.

Das HLA-B27-Molekül wird außerdem von inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren erkannt. Solange eine Interaktion zwischen inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren und MHC-Klasse-I-Molekülen gewährleistet ist, wird dadurch eine Lyse der erkannten Zelle verhindert („express yourself or die“). Wenn die NK-Zelle an eine Zelle bindet, die nicht ausreichend viele, keine oder veränderte MHC-Klasse-I-Moleküle trägt, fällt dieses inhibitorische Signal weg, was eine Lyse der Zelle zur Folge hat (Moretta *et al.*, 1996; Lanier, 1998). Eine aufgrund intrazellulär retinierter B27-HC herabgesetzte MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression könnte daher eine NK-Zell-Antwort provozieren (Malnati *et al.*, 1995; Peruzzi *et al.*, 1996; Parham, 1996; Luque *et al.*, 1996).

Diese Überlegungen verdeutlichen, dass eine verminderte oder aberrante HLA-B27-Expression immunmodulatorische Effekte im Sinne einer erhöhten Zelllyse zur Folge haben könnte. Es ist somit umgekehrt vorstellbar, dass durch die oben postulierte Reexpression klassischer HLA-B27-Moleküle die Interaktion mit HLA-B27-bindenden immunkompetenten Zellen beeinflusst und Zelldepletionskaskaden inhibiert werden. Derartige Mechanismen würden einerseits die Abnahme HLA-B27-niedrig- oder fehlerhaft exprimierender Zellen und andererseits die Zunahme HLA-B27-hochexprimierender Zellen begünstigen.

Aufgrund unserer Ergebnisse und der aktuell verfügbaren Daten in der Literatur halten wir die Hochregulation der HLA-B27-Expression in Verbindung mit einer modifizierten Zell-Zell-Interaktion für den wahrscheinlicheren Mechanismus. Dieser Erklärungsansatz ist vereinbar mit dem gegenwärtig favorisierten pathogenetischen Modell der fehlerhaften HLA-B27-Prozessierung und der derzeit diskutierten Beteiligung von TNF bei der Manifestation der AS.

Die folgende Abbildung fasst das Gesagte zusammen:



**Abb. 19:** Postulierte Mechanismen der HLA-B27 und MHC-Klasse-I-Expressionszunahme auf Lymphozyten unter Infliximab

## **V. ZUSAMMENFASSUNG**

In der vorliegenden Arbeit wurden therapeutische und immunmodulatorische Effekte einer TNF-Blockade bei Patienten mit aktiver Spondylitis ankylosans untersucht. Hierzu wurde an 10 Patienten während einer 60wöchigen Infliximabtherapie eine Evaluation von Therapiewirksamkeit und –sicherheit, sowie eine durchflusszytometrische Analyse der HLA-Oberflächenexpression auf Lymphozyten vorgenommen.

Von 8 Patienten wurde die Therapie ohne ernste Nebenwirkungen gut vertragen und führte zur raschen und dauerhaften Verbesserung der klinischen, laborchemischen und radiologischen Verlaufsparemeter. Ein Patient entwickelte nach initialer Wirksamkeit ein sekundäres Therapieversagen, bei einem weiteren Patienten wurde die Therapie unter dem Verdacht eines medikamentös induzierten Lupus-Syndroms abgebrochen.

Gegen Mitte des Behandlungszeitraumes konnte ein am deutlichsten auf den B-Lymphozyten ausgeprägter Anstieg der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression beobachtet werden. Die Expressionszunahme ist möglicherweise Ausdruck immunmodulatorischer Effekte, die mit der langfristigen Therapiewirksamkeit assoziiert sind.

Für die Zunahme der Oberflächenexpression kommen folgende Mechanismen in Frage:

1. eine vermehrte intravasale Kompartimentierung primär hoch exprimierender Zellen oder
2. eine durch die TNF-Suppression induzierte Hochregulation einer zuvor niedrigeren HLA-B27-Oberflächenexpression.

Angesichts unserer Ergebnisse und der aktuell in der Literatur verfügbaren Daten halten wir letzteren Mechanismus für wahrscheinlicher. Innerhalb dieses Erklärungsmodells ist die bei Therapiebeginn niedrigere HLA-B27-Expression bedingt durch die Expression einer verminderten Anzahl von HLA-B27-Molekülen oder aberranter  $\beta_2m$ -freier Varianten, die durch die von uns verwendeten konformationsabhängigen Antikörpern nicht detektierbar sind. Unter Hemmung des TNF-Einflusses kommt es schließlich zur schrittweisen Wiederherstellung der physiologischen Prozessierung trimolekularer HLA-B27-Oberflächenantigene mit konsekutiv vermehrter AK-Bindung. Eine verminderte oder aberrante HLA-B27-Expression ist möglicherweise mit immunmodulatorischen Effekten im Sinne einer erhöhten Zelldepletion assoziiert. Durch die Reexpression trimolekularer HLA-B27-Moleküle wird die Interaktion zwischen immunkompetenten Zellen und HLA-B27-positiven Zellen beeinflusst, wodurch das Zellüberleben begünstigt wird. Dieser Erklärungsansatz ist vereinbar mit dem gegenwärtig favorisierten pathogenetischen Modell der fehlerhaften HLA-B27-Prozessierung und der derzeit diskutierten Beteiligung von TNF bei der Manifestation der AS.

## **VI. AUSBLICK**

Bereits vor seiner Zulassung für die AS zeichnet sich ab, dass AS-Patienten von Infliximab möglicherweise noch mehr profitieren als RA-Patienten (Gorman *et al.*, 2002). Da die Invalidität von AS-Patienten weitaus höher ist, als bisher angenommen und neben NSAR wenig befriedigende Therapieoptionen zu Verfügung stehen (vgl. I.1.), könnten TNF-Antagonisten einen vielversprechenden Therapieansatz bei schweren Krankheitsverläufen darstellen.

Ein großer Nachteil aller Biologicals sind jedoch die damit verbundenen Kosten. Der Rezeptpreis für 100 mg Infliximab beträgt 927 Euro. Für die Therapie eines 70kg schweren Patienten bedeutet dies 3245 Euro/Infusion. Deshalb ist neben der Erstellung von Therapierichtlinien zur Selektion geeigneter Patienten die Suche nach einem therapeutischen Gesamtkonzept, das sowohl Patientensicherheit, als auch die limitierten finanziellen Ressourcen des Gesundheitssystems berücksichtigt, vordringlich.

In der Rheumaeinheit der Poliklinik München wurde hierzu ein teilstationäres Modell entwickelt, das neben einer hohen Patientensicherheit eine beträchtliche Kosteneinsparung ermöglicht (Wittwer *et al.*, 2003). Kellner *et al.* haben zudem erste Berichte veröffentlicht, die eine MRT-gesteuerte intraartikuläre Injektion von Infliximab favorisieren (Kellner *et al.*, 2002). Die gezielte lokale Applikation einer wesentlich geringeren Infliximabdosis könnte das Auftreten systemischer Nebenwirkungen vermindern und Arzneimittelkosten senken und damit eine wegweisende Alternative zur bisherigen intravenösen Verabreichung darstellen.

Die Untersuchung der durch eine TNF-Blockade induzierten immunologischen Effekte könnte wesentlich zum Verständnis der bei der AS beteiligten Pathomechanismen beitragen. Die in dieser Arbeit diskutierten immunmodulatorischen Mechanismen sind an größeren Patientenkollektiven und unter Einschluss anderer MHC-Klasse-I-Oberflächenantigene, wie z.B. HLA-A2 oder HLA-B7 zu prüfen. In absehbarer Zeit wird zudem ein HC-B27-spezifischer AK verfügbar sein (Bowness, 2002), der es erlaubt, die postulierte Expression  $\beta_2$ m-freier HLA-B27-Moleküle besser zu untersuchen.

[Nachtrag nach der mündlichen Prüfung:

Aufgrund der TNF-AS-2-Studie wurde Infliximab im Juni 2003 für die Therapie der AS in Europa zugelassen. Die Zulassungsstudie in den USA wird gerade durchgeführt. Im Januar 2004 wurde auch Etanercept für die Therapie der AS zugelassen.]

## **VII. LITERATURVERZEICHNIS**

- Aggarwal, B.B., Eessalu, T.E. & Hass, P.E. (1985). Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature*, 318, 665-7.
- Ahlstrom, H., Feltelius, N., Nyman, R. & Hallgren, R. (1990). Magnetic resonance imaging of sacroiliac joint inflammation. *Arthritis Rheum*, 33, 1763-9.
- Allen, R.L., O'Callaghan, C.A., McMichael, A.J. & Bowness, P. (1999). Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol*, 162, 5045-8.
- Allen, R.L., Raine, T., Haude, A., Trowsdale, J. & Wilson, M.J. (2001). Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J Immunol*, 167, 5543-7.
- Alvarez, I., Sesma, L., Marcilla, M., Ramos, M., Marti, M., Camafeita, E. & de Castro, J.A. (2001). Identification of novel HLA-B27 ligands derived from polymorphic regions of its own or other class I molecules based on direct generation by 20 S proteasome. *J Biol Chem*, 276, 32729-37.
- Alvaro-Gracia, J.M., Zvaifler, N.J. & Firestein, G.S. (1990). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Clin Invest*, 86, 1790-8.
- Amor, B., Kahan, A. & Georgiadis, A.E. (1978). Transient loss of HLA B27. *Lancet*, 1, 284.
- Anderson, J.J., Baron, G., van der Heijde, D., Felson, D.T. & Dougados, M. (2001). Ankylosing spondylitis assessment group preliminary definition of short-term improvement in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 44, 1876-86.
- Averns, H.L., Oxtoby, J., Taylor, H.G., Jones, P.W., Dziedzic, K. & Dawes, P.T. (1996). Radiological outcome in ankylosing spondylitis: use of the Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score (SASSS). *Br J Rheumatol*, 35, 373-6.
- Baeten, D., Kruithof, E., Van den Bosch, F., Demetter, P., Van Damme, N., Cuvelier, C., De Vos, M., Mielants, H., Veys, E.M. & De Keyser, F. (2001). Immunomodulatory effects of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on synovium in spondylarthropathy: histologic findings in eight patients from an open-label pilot study. *Arthritis Rheum*, 44, 186-95.
- Ball, E.J. & Khan, M.A. (2001). HLA-B27 polymorphism. *Joint Bone Spine*, 68, 378-82.
- Ball, J. (1971). Enthesopathy of rheumatoid and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 30, 213-23.
- Barnes, P.J. & Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 336, 1066-71.
- Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F. & Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell*, 14, 9-20.
- Barrera, P., Joosten, L.A., den Broeder, A.A., van de Putte, L.B., van Riel, P.L. & van den Berg, W.B. (2001). Effects of treatment with a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody on the local and systemic homeostasis of interleukin 1 and TNFalpha in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 60, 660-9.
- Baud, V. & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11, 372-7.

- Bechterew, W. (1893). Steifigkeit der Wirbelsäule und ihre Verkrümmung als besondere Krankheitsform. *Neurol Zentralbl*, 12, 327-337.
- Beg, A.A. & Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, 274, 782-4.
- Benitez-Del-Castillo, J.M., Garcia-Sanchez, J., Iradier, T. & Banares, A. (2000). Sulfasalazine in the prevention of anterior uveitis associated with ankylosing spondylitis. *Eye*, 14, 340-3.
- Benjamin, R. & Parham, P. (1990). Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*, 11, 137-42.
- Benjamin, R. & Parham, P. (1992). HLA-B27 and disease: a consequence of inadvertent antigen presentation? *Rheum Dis Clin North Am*, 18, 11-21.
- Benjamin, R.J., Madrigal, J.A. & Parham, P. (1991). Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells. *Nature*, 351, 74-7.
- Beutler, B., Mahoney, J., Le Trang, N., Pekala, P. & Cerami, A. (1985). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med*, 161, 984-95.
- Biasi, D., Carletto, A., Caramaschi, P., Pacor, M.L., Maleknia, T. & Bambara, L.M. (2000). Efficacy of methotrexate in the treatment of ankylosing spondylitis: a three-year open study. *Clin Rheumatol*, 19, 114-7.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. & Cerretti, D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- alpha from cells. *Nature*, 385, 729-33.
- Boeger, C.A., Wittwer, H., Schattenkirchner, M., Kellner, H. & Kellner, W. (2001). Treatment of ankylosing spondylitis with infliximab. *Ann Rheum Dis*, 60, 1159-60.
- Boisgerault, F., Mounier, J., Tieng, V., Stolzenberg, M.C., Khalil-Daher, I., Schmid, M., Sansonetti, P., Charron, D. & Toubert, A. (1998). Alteration of HLA-B27 peptide presentation after infection of transfected murine L cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 66, 4484-90.
- Bollow, M., Braun, J., Hamm, B., Eggens, U., Schilling, A., Konig, H. & Wolf, K.J. (1995). Early sacroiliitis in patients with spondyloarthropathy: evaluation with dynamic gadolinium-enhanced MR imaging. *Radiology*, 194, 529-36.
- Bollow, M., Enzweiler, C., Taupitz, M., Golder, W., Hamm, B., Sieper, J. & Braun, J. (2002). Use of contrast enhanced magnetic resonance imaging to detect spinal inflammation in patients with spondyloarthritides. *Clin Exp Rheumatol*, 20, S167-74.
- Bollow, M., Fischer, T., Reissauer, H., Backhaus, M., Sieper, J., Hamm, B. & Braun, J. (2000). Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis*, 59, 135-40.
- Boonen, A., Chorus, A., Miedema, H., van der Heijde, D., van der Tempel, H. & van der Linden, S. (2001). Employment, work disability, and work days lost in patients with ankylosing spondylitis: a cross sectional study of Dutch patients. *Ann Rheum Dis*, 60, 353-8.
- Boussiotis, V.A., Nadler, L.M., Strominger, J.L. & Goldfeld, A.E. (1994). Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7007-11.
- Bowness, P. (2002). HLA B27 in health and disease: a double-edged sword? *Rheumatology (Oxford)*, 41, 857-68.



- Boyle, L.H. & Hill Gaston, J.S. (2003). Breaking the rules: the unconventional recognition of HLA-B27 by CD4+ T lymphocytes as an insight into the pathogenesis of the spondyloarthropathies. *Rheumatology (Oxford)*, 42, 404-12.
- Brandt, J., Haibel, H., Cornely, D., Golder, W., Gonzalez, J., Reddig, J., Thriene, W., Sieper, J. & Braun, J. (2000). Successful treatment of active ankylosing spondylitis with the anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody infliximab. *Arthritis Rheum*, 43, 1346-52.
- Brandt, J., Listing, J., Alten, R., Burmester, G., Gromnica-Ihle, E., Schneider, M., Sörensen, H., Zeidler, H., Reddig, J., Sieper, J. & Braun, J. (2002). One year results of a double-blind placebo controlled, Phase-III, clinical trial of Infliximab in active ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 46, (S)429.
- Braun, J., Baraliakos, X., Golder, W., Brandt, J., Rudwaleit, M., Listing, J., Bollow, M., Sieper, J. & Van Der Heijde, D. (2003). Magnetic resonance imaging examinations of the spine in patients with ankylosing spondylitis, before and after successful therapy with infliximab: evaluation of a new scoring system. *Arthritis Rheum*, 48, 1126-36.
- Braun, J., Bollow, M., Eggens, U., König, H., Distler, A. & Sieper, J. (1994). Use of dynamic magnetic resonance imaging with fast imaging in the detection of early and advanced sacroiliitis in spondylarthropathy patients. *Arthritis Rheum*, 37, 1039-45.
- Braun, J., Bollow, M., Neure, L., Seipelt, E., Seyrekbasan, F., Herbst, H., Eggens, U., Distler, A. & Sieper, J. (1995). Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 38, 499-505.
- Braun, J., Bollow, M., Remlinger, G., Eggens, U., Rudwaleit, M., Distler, A. & Sieper, J. (1998a). Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum*, 41, 58-67.
- Braun, J., Bollow, M., Seyrekbasan, F., Haberle, H.J., Eggens, U., Mertz, A., Distler, A. & Sieper, J. (1996). Computed tomography guided corticosteroid injection of the sacroiliac joint in patients with spondyloarthropathy with sacroiliitis: clinical outcome and followup by dynamic magnetic resonance imaging. *J Rheumatol*, 23, 659-64.
- Braun, J., Bollow, M. & Sieper, J. (1998b). Radiologic diagnosis and pathology of the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am*, 24, 697-735.
- Braun, J., Brandt, J., Listing, J., Zink, A., Alten, R., Golder, W., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Krause, A., Schneider, M., Sorensen, H., Zeidler, H., Thriene, W. & Sieper, J. (2002). Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet*, 359, 1187-93.
- Braun, J., Lemmel, E.M., Manger, B., Rau, R., Sorensen, H. & Sieper, J. (2001). [Therapy of ankylosing spondylitis (AS) with radium chloride (224SpondylAT)]. *Z Rheumatol*, 60, 74-83.
- Braun, J. & Sieper, J. (2002). Building consensus on nomenclature and disease classification for ankylosing spondylitis: results and discussion of a questionnaire prepared for the International Workshop on New Treatment Strategies in Ankylosing Spondylitis, Berlin, Germany, 18-19 January 2002. *Ann Rheum Dis*, 61 Suppl 3, iii61-7.
- Braun, J. & van der Heijde, D. (2002). Imaging and scoring in ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 16, 573-604.
- Breban, M., Vignon, E., Claudepierre, P., Devauchelle, V., Wendling, D., Lespessailles, E., Euller-Ziegler, L., Sibilia, J., Perdriger, A., Mezieres, M., Alexandre, C. & Dougados, M. (2002). Efficacy of infliximab in refractory ankylosing spondylitis: results of a six-month open-label study. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 1280-5.
- Brenner, M.K. (1988). Tumour necrosis factor. *Br J Haematol*, 69, 149-52.
- Brodie, B.C. (1850). *Pathological und Surgical Observations on the Diseases of the joints*.

- Brown, M.A., Jepson, A., Young, A., Whittle, H.C., Greenwood, B.M. & Wordsworth, B.P. (1997). Ankylosing spondylitis in West Africans -evidence for a non-HLA-B27 protective effect. *Ann Rheum Dis*, 56, 68-70.
- Brown, M.A., Pile, K.D., Kennedy, L.G., Campbell, D., Andrew, L., March, R., Shatford, J.L., Weeks, D.E., Calin, A. & Wordsworth, B.P. (1998). A genome-wide screen for susceptibility loci in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 41, 588-95.
- Calabrese, L. & Fleischer, A.B. (2000). Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med*, 108, 487-95.
- Calin, A., Taurog JD., (1998). *The spondylarthritides*. Oxford University Press, Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP.
- Calin, A., Garrett, S., Whitelock, H., Kennedy, L.G., O'Hea, J., Mallorie, P. & Jenkinson, T. (1994). A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol*, 21, 2281-5.
- Calin, A., Mackay, K., Santos, H. & Brophy, S. (1999a). A new dimension to outcome: application of the Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index. *J Rheumatol*, 26, 988-92.
- Calin, A., Nakache, J.P., Gueguen, A., Zeidler, H., Mielants, H. & Dougados, M. (1999b). Defining disease activity in ankylosing spondylitis: is a combination of variables (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) an appropriate instrument? *Rheumatology (Oxford)*, 38, 878-82.
- Calin, A., Nakache, J.P., Gueguen, A., Zeidler, H., Mielants, H. & Dougados, M. (1999c). Outcome variables in ankylosing spondylitis: evaluation of their relevance and discriminant capacity. *J Rheumatol*, 26, 975-9.
- Carbone, L.D., Cooper, C., Michet, C.J., Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M. & Melton, L.J., 3rd. (1992). Ankylosing spondylitis in Rochester, Minnesota, 1935-1989. Is the epidemiology changing? *Arthritis Rheum*, 35, 1476-82.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3666-70.
- Cauli, A., Dessole, G., Fiorillo, M.T., Vacca, A., Mameli, A., Bitti, P., Passiu, G., Sorrentino, R. & Mathieu, A. (2002). Increased level of HLA-B27 expression in ankylosing spondylitis patients compared with healthy HLA-B27-positive subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 1375-9.
- Charles, P., Elliott, M.J., Davis, D., Potter, A., Kalden, J.R., Antoni, C., Breedveld, F.C., Smolen, J.S., Eberl, G., deWoody, K., Feldmann, M. & Maini, R.N. (1999). Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 163, 1521-8.
- Charles, P.J., Smeenk, R.J., De Jong, J., Feldmann, M. & Maini, R.N. (2000). Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. *Arthritis Rheum*, 43, 2383-90.
- Chorus, A.M., Miedema, H.S., Boonen, A. & Van Der Linden, S. (2003). Quality of life and work in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis of working age. *Ann Rheum Dis*, 62, 1178-1184.
- Choy, E.H. & Panayi, G.S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 344, 907-16.
- Chu, C.Q., Field, M., Feldmann, M. & Maini, R.N. (1991). Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34, 1125-32.

- Clegg, D.O., Reda, D.J., Weisman, M.H., Blackburn, W.D., Cush, J.J., Cannon, G.W., Mahowald, M.L., Schumacher, H.R., Jr., Taylor, T., Budiman-Mak, E., Cohen, M.R., Vasey, F.B., Luggen, M.E., Mejias, E., Silverman, S.L., Makkena, R., Alepa, F.P., Buxbaum, J., Haakenson, C.M., Ward, R.H., Manaster, B.J., Anderson, R.J., Ward, J.R. & Henderson, W.G. (1996). Comparison of sulfasalazine and placebo in the treatment of ankylosing spondylitis. A Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *Arthritis Rheum*, 39, 2004-12.
- Colbert, L.H., Davis, J.M., Essig, D.A., Ghaffar, A. & Mayer, E.P. (2001). Tissue expression and plasma concentrations of TNFalpha, IL-1beta, and IL-6 following treadmill exercise in mice. *Int J Sports Med*, 22, 261-7.
- Colbert, R.A. (2000). HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? *Mol Med Today*, 6, 224-30.
- Cope, A.P., Liblau, R.S., Yang, X.D., Congia, M., Laudanna, C., Schreiber, R.D., Probert, L., Kollias, G. & McDevitt, H.O. (1997). Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *J Exp Med*, 185, 1573-84.
- Creamer, P., Edmonds, J., Sullivan, J. & Matthews, S. (1992). Measurement of HLA class I expression in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 51, 1138-42.
- Crew, M.D., Effros, R.B., Walford, R.L., Zeller, E., Cheroutre, H. & Brahn, E. (1998). Transgenic mice expressing a truncated *Peromyscus leucopus* TNF-alpha gene manifest an arthritis resembling ankylosing spondylitis. *J Interferon Cytokine Res*, 18, 219-25.
- D'Agostino, M.A., Said-Nahal, R., Hacquard-Bouder, C., Brasseur, J.L., Dougados, M. & Breban, M. (2003). Assessment of peripheral enthesitis in the spondylarthropathies by ultrasonography combined with power Doppler: a cross-sectional study. *Arthritis Rheum*, 48, 523-33.
- Dangoria, N.S., DeLay, M.L., Kingsbury, D.J., Mear, J.P., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. & Colbert, R.A. (2002). HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 277, 23459-68.
- Davenport, M.P. (1995). The promiscuous B27 hypothesis. *Lancet*, 346, 500-1.
- De Keyser, F., Van Damme, N., De Vos, M., Mielants, H. & Veys, E.M. (2000). Opportunities for immune modulation in the spondyloarthropathies with special reference to gut inflammation. *Inflamm Res*, 49, 47-54.
- De Rycke, L., Kruithof, E., Van Damme, N., Hoffman, I.E., Van den Bossche, N., Van den Bosch, F., Veys, E.M. & De Keyser, F. (2003). Antinuclear antibodies following infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathy. *Arthritis Rheum*, 48, 1015-23.
- Debandt, M., Vittecoq, O., Descamps, V., Le Loet, X. & Meyer, O. (2003). Anti-TNF-alpha-induced systemic lupus syndrome. *Clin Rheumatol*, 22, 56-61.
- Decoster, E., Vanhaesebroeck, B., Vandenabeele, P., Grooten, J. & Fiers, W. (1995). Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem*, 270, 18473-8.
- den Broeder, A.A., Joosten, L.A., Saxne, T., Heinegard, D., Fenner, H., Miltenburg, A.M., Frasa, W.L., van Tits, L.J., Buurman, W.A., van Riel, P.L., van de Putte, L.B. & Barrera, P. (2002). Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann Rheum Dis*, 61, 311-8.
- Doran, M.F., Brophy, S., Mackay, K., Taylor, G. & Calin, A. (2003). Predictors of longterm outcome in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 30, 316-20.

- Dougados, M., Behier, J.M., Jolchine, I., Calin, A., van der Heijde, D., Olivieri, I., Zeidler, H. & Herman, H. (2001). Efficacy of celecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, in the treatment of ankylosing spondylitis: a six-week controlled study with comparison against placebo and against a conventional nonsteroidal antiinflammatory drug. *Arthritis Rheum*, 44, 180-5.
- Dougados, M., Gueguen, A., Nakache, J.P., Velicitat, P., Zeidler, H., Veys, E. & Calin, A. (1999). Clinical relevance of C-reactive protein in axial involvement of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 26, 971-4.
- Dougados, M., van der Linden, S., Leirisalo-Repo, M., Huitfeldt, B., Juhlin, R., Veys, E., Zeidler, H., Kvien, T.K., Olivieri, I., Dijkmans, B. & et al. (1995). Sulfasalazine in the treatment of spondylarthropathy. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum*, 38, 618-27.
- Dougados, M. & van der Heijde, D. (2002). Ankylosing spondylitis: how should the disease be assessed? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 16, 605-18.
- Dougados, M., van der Linden, S., Juhlin, R., Huitfeldt, B., Amor, B., Calin, A., Cats, A., Dijkmans, B., Olivieri, I., Pasero, G. & et al. (1991). The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum*, 34, 1218-27.
- el-Zaatari, F.A., Sams, K.C. & Taurog, J.D. (1990). In vitro mutagenesis of HLA-B27. Amino acid substitutions at position 67 disrupt anti-B27 monoclonal antibody binding in direct relation to the size of the substituted side chain. *J Immunol*, 144, 1512-7.
- el-Zaatari, F.A. & Taurog, J.D. (1992). In vitro mutagenesis of HLA-B27: single and multiple amino acid substitutions at consensus B27 sites identify distinct monoclonal antibody-defined epitopes. *Hum Immunol*, 33, 243-8.
- Feldmann, M. & Maini, R.N. (2001). Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*, 19, 163-96.
- Feldmann, M., Maini, R.N., Bondeson, J., Taylor, P., Foxwell, B.M. & Brennan, F.M. (2001). Cytokine blockade in rheumatoid arthritis. *Adv Exp Med Biol*, 490, 119-27.
- Feldtkeller, E. (1999). [Age at disease onset and delayed diagnosis of spondyloarthropathies]. *Z Rheumatol*, 58, 21-30.
- Feldtkeller, E. & Braun, J. (2000). Impact of sex on inheritance of ankylosing spondylitis. *Lancet*, 355, 1096-7; author reply 1098.
- Feltkamp, T.E. & Ringrose, J.H. (1998). Acute anterior uveitis and spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol*, 10, 314-8.
- Fiebig, E.W., Johnson, D.K., Hirschhorn, D.F., Knape, C.C., Webster, H.K., Lowder, J. & Busch, M.P. (1997). Lymphocyte subset analysis on frozen whole blood. *Cytometry*, 29, 340-50.
- Francois, R.J., Braun, J. & Khan, M.A. (2001). Entheses and enthesitis: a histopathologic review and relevance to spondyloarthritides. *Curr Opin Rheumatol*, 13, 255-64.
- Francois, R.J., Gardner, D.L., Degraeve, E.J. & Bywaters, E.G. (2000). Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. *Arthritis Rheum*, 43, 2011-24.
- Furuta, H., Thorpy, M.J. & Temple, H.M. (2001). Comparison in symptoms between aged and younger patients with narcolepsy. *Psychiatry Clin Neurosci*, 55, 241-2.
- Garcia, F., Marina, A., Albar, J.P. & Lopez de Castro, J.A. (1997). HLA-B27 presents a peptide from a polymorphic region of its own molecule with homology to proteins from arthritogenic bacteria. *Tissue Antigens*, 49, 23-8.

- Genovese, M.C., Bathon, J.M., Martin, R.W., Fleischmann, R.M., Tesser, J.R., Schiff, M.H., Keystone, E.C., Wasko, M.C., Moreland, L.W., Weaver, A.L., Markenson, J., Cannon, G.W., Spencer-Green, G. & Finck, B.K. (2002). Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis Rheum*, 46, 1443-50.
- Ghosh, S. & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109 Suppl, S81-96.
- Girdlestone, J. (2000). Synergistic induction of HLA class I expression by RelA and CIITA. *Blood*, 95, 3804-8.
- Gobin, S.J., Keijsers, V., van Zutphen, M. & van den Elsen, P.J. (1998). The role of enhancer A in the locus-specific transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes by nuclear factor kappa B. *J Immunol*, 161, 2276-83.
- Gonzalez, S., Torre-Alonso, J.C., Martinez-Borra, J., Fernandez Sanchez, J.A., Lopez-Vazquez, A., Rodriguez Perez, A. & Lopez-Larrea, C. (2001). TNF-238A promoter polymorphism contributes to susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative patients. *J Rheumatol*, 28, 1288-93.
- Gonzalez-Lopez, L., Garcia-Gonzalez, A., Vazquez-del-Mercado, M., Munoz-Valle, J. & Gamez-Nava, J. (2002). Efficacy of Methotrexate in Ankylosing Spondylitis: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Arthritis Rheum*, 46, (S)433.
- Gorga, J.C., Madden, D.R., Prendergast, J.K., Wiley, D.C. & Strominger, J.L. (1992). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the human major histocompatibility antigen HLA-B27. *Proteins*, 12, 87-90.
- Gorman, J.D., Sack, K.E. & Davis, J.C., Jr. (2002). Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med*, 346, 1349-56.
- Goulder, P.J., Brander, C., Tang, Y., Tremblay, C., Colbert, R.A., Addo, M.M., Rosenberg, E.S., Nguyen, T., Allen, R., Trocha, A., Altfeld, M., He, S., Bunce, M., Funkhouser, R., Pelton, S.I., Burchett, S.K., McIntosh, K., Korber, B.T. & Walker, B.D. (2001). Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature*, 412, 334-8.
- Gran, J.T. & Skomsvoll, J.F. (1997). The outcome of ankylosing spondylitis: a study of 100 patients. *Br J Rheumatol*, 36, 766-71.
- Gratacos, J., Collado, A., Filella, X., Sanmarti, R., Canete, J., Llena, J., Molina, R., Ballesta, A. & Munoz-Gomez, J. (1994). Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol*, 33, 927-31.
- Gravallese, E.M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E. & Goldring, S.R. (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*, 43, 250-8.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. & et al. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83, 793-802.
- Hallermalm, K., Seki, K., Wei, C., Castelli, C., Rivoltini, L., Kiessling, R. & Levitskaya, J. (2001). Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood*, 98, 1108-15.
- Hamersma, J., Cardon, L.R., Bradbury, L., Brophy, S., van der Horst-Bruinsma, I., Calin, A. & Brown, M.A. (2001). Is disease severity in ankylosing spondylitis genetically determined? *Arthritis Rheum*, 44, 1396-400.
- Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P. & Taurog, J.D. (1990). Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*, 63, 1099-112.

- Haywood, K.L., A, M.G., Jordan, K., Dziedzic, K. & Dawes, P.T. (2002). Disease-specific, patient-assessed measures of health outcome in ankylosing spondylitis: reliability, validity and responsiveness. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 1295-302.
- Huang, F., Wei, J.C. & Breban, M. (2002). Thalidomide in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol*, 20, S158-61.
- Hubbard, A.K. & Rothlein, R. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*, 28, 1379-86.
- Husby, G. & Williams, R.C., Jr. (1988). Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, 1, 363-71.
- Ikawa, T., Ikeda, M., Yamaguchi, A., Tsai, W.C., Tamura, N., Seta, N., Trucksess, M., Raybourne, R.B. & Yu, D.T. (1998). Expression of arthritis-causing HLA-B27 on Hela cells promotes induction of c-fos in response to in vitro invasion by Salmonella typhimurium. *J Clin Invest*, 101, 263-72.
- Jain, A., Nanchahal, J., Troeberg, L., Green, P. & Brennan, F. (2001). Production of cytokines, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 by tenosynovium demonstrates its potential for tendon destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 44, 1754-60.
- Jarozeski, M., Heller R. (1998). *Flow Cytometry Protocols*. Humana Press: Totowa, New Jersey.
- Jenkinson, T.R., Mallorie, P.A., Whitelock, H.C., Kennedy, L.G., Garrett, S.L. & Calin, A. (1994). Defining spinal mobility in ankylosing spondylitis (AS). The Bath AS Metrology Index. *J Rheumatol*, 21, 1694-8.
- Jones, G., Halbert, J., Crotty, M., Shanahan, E.M., Batterham, M. & Ahern, M. (2003). The effect of treatment on radiological progression in rheumatoid arthritis: a systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Rheumatology (Oxford)*, 42, 6-13.
- Kapasi, K. & Inman, R.D. (1994). ME1 epitope of HLA-B27 confers class I-mediated modulation of gram-negative bacterial invasion. *J Immunol*, 153, 833-40.
- Kaslow, R.A., Carrington, M., Apple, R., Park, L., Munoz, A., Saah, A.J., Goedert, J.J., Winkler, C., O'Brien, S.J., Rinaldo, C., Detels, R., Blattner, W., Phair, J., Erlich, H. & Mann, D.L. (1996). Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med*, 2, 405-11.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R.P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W.D., Siegel, J.N. & Braun, M.M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*, 345, 1098-104.
- Keane, J., Remold, H.G. & Kornfeld, H. (2000). Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol*, 164, 2016-20.
- Kellner, H., Kroetz, M., Schattenkirchner, M. & Kellner, W. (2002). Successful therapy of sacroileitis in AS patients by intraarticular injection of Infliximab. *Arthritis Rheum*, 46, (S)431.
- Kellner, H. & Yu, D. (1992). The pathogenetic aspects of spondyloarthropathies from the point of view of HLA-B27. *Rheumatol Int*, 12, 121-7.
- Khan, M.A. & Ball, E.J. (2002). Genetic aspects of ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 16, 675-90.
- Khan, M.A., van der Linden, S.M., Kushner, I., Valkenburg, H.A. & Cats, A. (1985). Spondylitic disease without radiologic evidence of sacroiliitis in relatives of HLA-B27 positive ankylosing spondylitis patients. *Arthritis Rheum*, 28, 40-3.

- Khare, S.D., Bull, M.J., Hanson, J., Luthra, H.S. & David, C.S. (1998). Spontaneous inflammatory disease in HLA-B27 transgenic mice is independent of MHC class II molecules: a direct role for B27 heavy chains and not B27-derived peptides. *J Immunol*, 160, 101-6.
- Khare, S.D., Hansen, J., Luthra, H.S. & David, C.S. (1996). HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/human beta2-microglobulin (beta2m) double transgenic mice with disrupted mouse beta2m. *J Clin Invest*, 98, 2746-55.
- Kim, K.N., Watanabe, S., Ma, Y., Thornton, S., Giannini, E.H. & Hirsch, R. (2000). Viral IL-10 and soluble TNF receptor act synergistically to inhibit collagen-induced arthritis following adenovirus-mediated gene transfer. *J Immunol*, 164, 1576-81.
- Kirveskari, J., He, Q., Leirisalo-Repo, M., Maki-Ikola, O., Wuorela, M., Putto-Laurila, A. & Granfors, K. (1999). Enterobacterial infection modulates major histocompatibility complex class I expression on mononuclear cells. *Immunology*, 97, 420-8.
- Kirveskari, J., Kellner, H., Wuorela, M., Soini, H., Frankenberger, B., Leirisalo-Repo, M., Weiss, E.H. & Granfors, K. (1997). False-negative serological HLA-B27 typing results may be due to altered antigenic epitopes and can be detected by polymerase chain reaction. *Br J Rheumatol*, 36, 185-9.
- Knight, D.M., Trinh, H., Le, J., Siegel, S., Shealy, D., McDonough, M., Scallon, B., Moore, M.A., Vilcek, J., Daddona, P. & et al. (1993). Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol*, 30, 1443-53.
- Kong, Y.Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E.R., Van, G., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., Lacey, D.L., Fish, E., Boyle, W.J. & Penninger, J.M. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402, 304-9.
- Kruithof, E., Van den Bosch, F., Baeten, D., Herrens, A., De Keyser, F., Mielants, H. & Veys, E.M. (2002). Repeated infusions of infliximab, a chimeric anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody, in patients with active spondyloarthritis: one year follow up. *Ann Rheum Dis*, 61, 207-12.
- Laitio, P., Virtala, M., Salmi, M., Pelliniemi, L.J., Yu, D.T. & Granfors, K. (1997). HLA-B27 modulates intracellular survival of *Salmonella enteritidis* in human monocytic cells. *Eur J Immunol*, 27, 1331-8.
- Laloux, L., Voisin, M.C., Allain, J., Martin, N., Kerboull, L., Chevalier, X. & Claudepierre, P. (2001). Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 60, 316-21.
- Lanier, L.L. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16, 359-93.
- Laurent, M.R. & Panayi, G.S. (1983). Acute-phase proteins and serum immunoglobulins in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 42, 524-8.
- Lee, J.I. & Burckart, G.J. (1998). Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol*, 38, 981-93.
- Leong, K.G. & Karsan, A. (2000). Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol*, 15, 1303-25.
- Levering, W., Wind, H., Sintnicolaas, K., Hooijkaas, H. & Gratama, J. (2002). The impact of cross reactivity of anti-HLA-B27 monoclonal antibodies on flow cytometric HLA-B27 screening. *Hum Immunol*, 63, S100.
- Levering, W., Wind, H., Sintnicolaas, K., Hooijkaas, H. & Gratama, J. (2003). Flow cytometric HLA-B27 screening: Cross-reactivity patterns of commercially available anti-HLA-B27 monoclonal antibodies with other HLA-B antigens. *Cytometry*, 54B, 28-38.

- Levering, W.H., van den Beemd, R., te Marvelde, J.G., van Beers, W.A., Hooijkaas, H., Sintnicolaas, K. & Gratama, J.W. (2000). External quality assessment of flow cytometric HLA-B27 typing. *Cytometry*, 42, 95-105.
- Lipsky, P.E., van der Heijde, D.M., St Clair, E.W., Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G.R. & Maini, R.N. (2000). Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med*, 343, 1594-602.
- Little, H. (1988). The natural history of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 15, 1179-80.
- Loetscher, H., Pan, Y.C., Lahm, H.W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. & Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 61, 351-9.
- Lopez-Larrea, C., Gonzalez, S. & Martinez-Borra, J. (1998). The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy. *Mol Med Today*, 4, 540-9.
- Luque, I., Solana, R., Galiani, M.D., Gonzalez, R., Garcia, F., Lopez de Castro, J.A. & Pena, J. (1996). Threonine 80 on HLA-B27 confers protection against lysis by a group of natural killer clones. *Eur J Immunol*, 26, 1974-7.
- MacEwan, D.J. (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*, 14, 477-92.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. & Wiley, D.C. (1992). The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*, 70, 1035-48.
- Maini, R., St Clair, E.W., Breedveld, F., Furst, D., Kalden, J., Weisman, M., Smolen, J., Emery, P., Harriman, G., Feldmann, M. & Lipsky, P. (1999). Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet*, 354, 1932-9.
- Maini, R.F., M. (2000). *TNFalpha antagonism and rheumatoid arthritis*. Science Press Ltd, 34-42 Cleveland Street, London, UK.
- Maini, R.N., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Davis, D., Macfarlane, J.D., Antoni, C., Leeb, B., Elliott, M.J., Woody, J.N., Schaible, T.F. & Feldmann, M. (1998). Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41, 1552-63.
- Maksymowych, W.P., Breban, M. & Braun, J. (2002a). Ankylosing spondylitis and current disease-controlling agents: do they work? *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 16, 619-30.
- Maksymowych, W.P., Jhangri, G.S., Lambert, R.G., Mallon, C., Buenviaje, H., Pedrycz, E., Luongo, R. & Russell, A.S. (2002b). Infliximab in ankylosing spondylitis: a prospective observational inception cohort analysis of efficacy and safety. *J Rheumatol*, 29, 959-65.
- Maksymowych, W.P., Lambert, R., Jhangri, G.S., Leclercq, S., Chiu, P., Wong, B., Aaron, S. & Russell, A.S. (2001). Clinical and radiological amelioration of refractory peripheral spondyloarthritis by pulse intravenous pamidronate therapy. *J Rheumatol*, 28, 144-55.
- Malik, P., Baba, E. & Strominger, J.L. (1999). Biotinylation of class I MHC molecules abrogates recognition by W6/32 antibody. *Tissue Antigens*, 53, 576-9.
- Malik, P., Klimovitsky, P., Deng, L.W., Boyson, J.E. & Strominger, J.L. (2002). Uniquely conformed peptide-containing beta 2-microglobulin-free heavy chains of HLA-B2705 on the cell surface. *J Immunol*, 169, 4379-87.
- Malnati, M.S., Peruzzi, M., Parker, K.C., Biddison, W.E., Ciccone, E., Moretta, A. & Long, E.O. (1995). Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science*, 267, 1016-8.



- Marie, P. (1898). Sur la Spondylose rhizomelique. *Rev Med*, 18, 285-315.
- Martinez-Borra, J., Gonzalez, S., Lopez-Vazquez, A., Gelaz, M.A., Armas, J.B., Kanga, U., Mehra, N.K. & Lopez-Larrea, C. (2000). HLA-B27 alone rather than B27-related class I haplotypes contributes to ankylosing spondylitis susceptibility. *Hum Immunol*, 61, 131-9.
- Marzo-Ortega, H., McGonagle, D., O'Connor, P. & Emery, P. (2001). Efficacy of etanercept in the treatment of the enthesal pathology in resistant spondylarthropathy: a clinical and magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum*, 44, 2112-7.
- Maugars, Y., Mathis, C., Vilon, P. & Prost, A. (1992). Corticosteroid injection of the sacroiliac joint in patients with seronegative spondylarthropathy. *Arthritis Rheum*, 35, 564-8.
- McGonagle, D., Gibbon, W. & Emery, P. (1998). Classification of inflammatory arthritis by enthesitis. *Lancet*, 352, 1137-40.
- McGonagle, D., Khan, M.A., Marzo-Ortega, H., O'Connor, P., Gibbon, W. & Emery, P. (1999). Enthesitis in spondyloarthropathy. *Curr Opin Rheumatol*, 11, 244-50.
- McGowan, N.W., Walker, E.J., Macpherson, H., Ralston, S.H. & Helfrich, M.H. (2001). Cytokine-activated endothelium recruits osteoclast precursors. *Endocrinology*, 142, 1678-81.
- Mear, J.P., Schreiber, K.L., Munz, C., Zhu, X., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Rowland-Jones, S.L. & Colbert, R.A. (1999). Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol*, 163, 6665-70.
- Mease, P.J., Goffe, B.S., Metz, J., VanderStoep, A., Finck, B. & Burge, D.J. (2000). Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet*, 356, 385-90.
- Menghini, V.V. & Arora, A.S. (2001). Infliximab-associated reversible cholestatic liver disease. *Mayo Clin Proc*, 76, 84-6.
- Mielants, H., De Vos, M., Cuvelier, C. & Veys, E.M. (1996a). The role of gut inflammation in the pathogenesis of spondyloarthropathies. *Acta Clin Belg*, 51, 340-9.
- Mielants, H., Veys, E.M., Cuvelier, C. & De Vos, M. (1996b). Course of gut inflammation in spondyloarthropathies and therapeutic consequences. *Baillieres Clin Rheumatol*, 10, 147-64.
- Miki, K. & Eddy, E.M. (2002). Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer of death domain. *Mol Cell Biol*, 22, 2536-43.
- Mohan, V.P., Scanga, C.A., Yu, K., Scott, H.M., Tanaka, K.E., Tsang, E., Tsai, M.M., Flynn, J.L. & Chan, J. (2001). Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*, 69, 1847-55.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M.C. & Moretta, L. (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol*, 14, 619-48.
- N., N. (2001). [Position of the German Society of Rheumatology on therapy of ankylosing spondylitis (AS) with radium chloride (224SpondylAT)]. *Z Rheumatol*, 60, 84-7.
- Neumuller, J., Fischer, M. & Eberl, R. (1993). Failure of the serological determination of HLA-B27 due to antigen masking in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*, 13, 163-7.
- Ohshima, S., Saeki, Y., Mima, T., Sasai, M., Nishioka, K., Ishida, H., Shimizu, M., Suemura, M., McCloskey, R. & Kishimoto, T. (1999). Long-term follow-up of the changes in circulating cytokines, soluble cytokine receptors, and white blood cell subset counts in patients with rheumatoid arthritis (RA) after monoclonal anti-TNF alpha antibody therapy. *J Clin Immunol*, 19, 305-13.

- Olivieri, I., Barozzi, L., Padula, A., De Matteis, M., Pierro, A., Cantini, F., Salvarani, C. & Pavlica, P. (1998). Retrocalcaneal bursitis in spondyloarthritis: assessment by ultrasonography and magnetic resonance imaging. *J Rheumatol*, 25, 1352-7.
- O'Shea, J.J., Ma, A. & Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 2, 37-45.
- Pacheco-Tena, C., Zhang, X., Stone, M., Burgos-Vargas, R. & Inman, R.D. (2002). Innate immunity in host-microbial interactions: beyond B27 in the spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol*, 14, 373-82.
- Paleolog, E.M., Hunt, M., Elliott, M.J., Feldmann, M., Maini, R.N. & Woody, J.N. (1996). Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39, 1082-91.
- Pamer, E. & Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, 16, 323-58.
- Pape, K.A., Khoruts, A., Mondino, A. & Jenkins, M.K. (1997). Inflammatory cytokines enhance the in vivo clonal expansion and differentiation of antigen-activated CD4+ T cells. *J Immunol*, 159, 591-8.
- Parham, P. (1996a). B27 polymorphism and peptide repertoire. *Clin Rheumatol*, 15 Suppl 1, 72-3.
- Parham, P. (1996b). Presentation of HLA class I-derived peptides: potential involvement in allorecognition and HLA-B27-associated arthritis. *Immunol Rev*, 154, 137-54.
- Peh, C.A., Burrows, S.R., Barnden, M., Khanna, R., Cresswell, P., Moss, D.J. & McCluskey, J. (1998). HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity*, 8, 531-42.
- Peruzzi, M., Wagtmann, N. & Long, E.O. (1996). A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B\*2705. *J Exp Med*, 184, 1585-90.
- Peschon, J.J., Torrance, D.S., Stocking, K.L., Glaccum, M.B., Otten, C., Willis, C.R., Charrier, K., Morrissey, P.J., Ware, C.B. & Mohler, K.M. (1998). TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol*, 160, 943-52.
- Rammensee, H.G., Falk, K. & Rotzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol*, 11, 213-44.
- Ramos, M., Paradela, A., Vazquez, M., Marina, A., Vazquez, J. & Lopez de Castro, J.A. (2002). Differential association of HLA-B\*2705 and B\*2709 to ankylosing spondylitis correlates with limited peptide subsets but not with altered cell surface stability. *J Biol Chem*, 277, 28749-56.
- Reinelt, S., Dedier, S., Asuni, G., Folkers, G. & Rognan, D. (2001). Mutation of Cys-67 alters the thermodynamic stability of the human leukocyte antigen HLA0-B\*2705. *J Biol Chem*, 276, 18472-7.
- Remicade TM Produktinformation [<http://www.centocor.com/remicade.htm>].
- Reveille, J.D., Ball, E.J. & Khan, M.A. (2001). HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol*, 13, 265-72.
- Ringrose, J.H. (1999). HLA-B27 associated spondyloarthritis, an autoimmune disease based on crossreactivity between bacteria and HLA-B27? *Ann Rheum Dis*, 58, 598-610.
- Rock, K.L., Gamble, S., Rothstein, L., Gramm, C. & Benacerraf, B. (1991). Dissociation of beta 2-microglobulin leads to the accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. *Cell*, 65, 611-20.
- Rodenburg, R.J., Ganga, A., van Lent, P.L., van de Putte, L.B. & van Venrooij, W.J. (2000). The antiinflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor alpha expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis Rheum*, 43, 1941-50.

- Romas, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J. (2002). Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone*, 30, 340-6.
- Rubin, L.A., Amos, C.I., Wade, J.A., Martin, J.R., Bale, S.J., Little, A.H., Gladman, D.D., Bonney, G.E., Rubenstein, J.D. & Siminovitch, K.A. (1994). Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum*, 37, 1212-20.
- Rudwaleit, M., Siebert, S., Yin, Z., Eick, J., Thiel, A., Radbruch, A., Sieper, J. & Braun, J. (2001). Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann Rheum Dis*, 60, 36-42.
- Ruuls, S.R. & Sedgwick, J.D. (1999). Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum Genet*, 65, 294-301.
- Said-Nahal, R., Miceli-Richard, C., Berthelot, J.M., Duche, A., Dernis-Labous, E., Le Blevec, G., Saraux, A., Perdriger, A., Guis, S., Claudepierre, P., Sibilia, J., Amor, B., Dougados, M. & Breban, M. (2000). The familial form of spondylarthropathy: a clinical study of 115 multiplex families. Groupe Francais d'Etude Genetique des Spondylarthropathies. *Arthritis Rheum*, 43, 1356-65.
- Saklatvala, J. (1986). Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*, 322, 547-9.
- Saleem, G., Li, S.C., MacPherson, B.R. & Cooper, S.M. (2001). Hepatitis with interface inflammation and IgG, IgM, and IgA anti-double-stranded DNA antibodies following infliximab therapy: comment on the article by Charles et al. *Arthritis Rheum*, 44, 1966-8.
- Sampaio-Barros, P.D., Costallat, L.T., Bertolo, M.B., Neto, J.F. & Samara, A.M. (2000). Methotrexate in the treatment of ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol*, 29, 160-2.
- Sandborn, W.J. & Hanauer, S.B. (1999). Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis*, 5, 119-33.
- Schaible, T.F. (2000). Long term safety of infliximab. *Can J Gastroenterol*, 14, 29C-32C.
- Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.J., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R., Raab, H. & et al. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, 61, 361-70.
- Schattenkirchner, M., Steinbauer-Rosenthal, I., Schurer, W., Scholz, S. & Albert, E.D. (1974). [Ankylosing spondylitis and the histocompatibility antigen HL-A 27]. *Verh Dtsch Ges Inn Med*, 80, 1414-8.
- Schlosstein, L., Terasaki, P.I., Bluestone, R. & Pearson, C.M. (1973). High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med*, 288, 704-6.
- Schmitz, G., Rothe G. (1994). Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer Verlag.
- Schotte H, W.P., Schorat MA, Schluter B, Domschke W, Gaubitz M. (2001). Longterm treatment with etanercept significantly reduces the number of TNFa and IL-1 producing peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 44, (S)375.
- Sharma, R.P., He, Q., Meredith, F.I., Riley, R.T. & Voss, K.A. (2002). Paradoxical role of tumor necrosis factor alpha in fumonisin-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicology*, 180, 221-32.
- Sheehan, N.J., Slavin, B.M., Donovan, M.P., Mount, J.N. & Mathews, J.A. (1986). Lack of correlation between clinical disease activity and erythrocyte sedimentation rate, acute phase proteins or protease inhibitors in ankylosing spondylitis. *Br J Rheumatol*, 25, 171-4.
- Sieper, J. & Braun, J. (1995). Pathogenesis of spondylarthropathies. Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both? *Arthritis Rheum*, 38, 1547-54.

- Smith, M.D., Slavotinek, J., Au, V., Weedon, H., Parker, A., Coleman, M., Roberts-Thomson, P.J. & Ahern, M.J. (2001). Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression. *Rheumatology (Oxford)*, 40, 965-77.
- Spoorenberg, A., van der Heijde, D., de Klerk, E., Dougados, M., de Vlam, K., Mielants, H., van der Tempel, H. & van der Linden, S. (1999). Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 26, 980-4.
- Stone, M., Salonen, D., Lax, M., Payne, U., Lapp, V. & Inman, R. (2001). Clinical and imaging correlates of response to treatment with infliximab in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 28, 1605-14.
- Strümpell, A. (1897). Bemerkung über die chronische ankylosierende Entzündung der Wirbelsäule und der Hüftgelenke. *Dtsch. Z. Nervenheilkd.*, 11, 338-342.
- Tak, P.P., Taylor, P.C., Breedveld, F.C., Smeets, T.J., Daha, M.R., Kluin, P.M., Meinders, A.E. & Maini, R.N. (1996). Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti- tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39, 1077-81.
- Tartaglia, L.A., Pennica, D. & Goeddel, D.V. (1993). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem*, 268, 18542-8.
- Taurog, J.D., Maika, S.D., Simmons, W.A., Breban, M. & Hammer, R.E. (1993). Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J Immunol*, 150, 4168-78.
- Taurog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T., Simmons, W.A., Zhou, M., Fernandez-Sueiro, J.L., Balish, E. & Hammer, R.E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*, 180, 2359-64.
- Temekonidis T.I., Alamanos Y., Nikas S.N., Bougias D.V., Georgiadis A.N., Voulgari P.V. & Drosos A.A. (2003). Infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis: an open label 12 month study. *Ann Rheum Dis*, 62, 1218-20.
- Tetta, C., Camussi, G., Modena, V., Di Vittorio, C. & Baglioni, C. (1990). Tumour necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with active and severe rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 49, 665-7.
- Tracey, K.J. & Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol*, 9, 317-43.
- Tsai, W.C., Chen, C.J., Yen, J.H., Ou, T.T., Tsai, J.J., Liu, C.S. & Liu, H.W. (2002). Free HLA class I heavy chain-carrying monocytes -a potential role in the pathogenesis of spondyloarthropathies. *J Rheumatol*, 29, 966-72.
- Uchanska-Ziegler, B. & Ziegler, A. (2003). Ankylosing spondylitis: a beta2m-deposition disease? *Trends Immunol*, 24, 73-6.
- Urban, R.G., Chiciz, R.M., Lane, W.S., Strominger, J.L., Rehm, A., Kenter, M.J., UytdeHaag, F.G., Ploegh, H., Uchanska-Ziegler, B. & Ziegler, A. (1994). A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 1534-8.
- Vaday, G.G. & Lider, O. (2000). Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol*, 67, 149-59.
- Vaday, G.G., Schor, H., Rahat, M.A., Lahat, N. & Lider, O. (2001). Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha- induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol*, 69, 613-21.

- Vaile, J.H., Meddings, J.B., Yacyshyn, B.R., Russell, A.S. & Maksymowych, W.P. (1999). Bowel permeability and CD45RO expression on circulating CD20+ B cells in patients with ankylosing spondylitis and their relatives. *J Rheumatol*, 26, 128-35.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. & Verma, I.M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*, 274, 787-9.
- Van de Putte LBA, v.R.R., den Broeder A et al. (1998). A single dose placebo controlled phase I study of the fully human ant-TNF-antibody D2E7 in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41, (S)57.
- Van den Berg, W., Joosten, LAB, Kollias G, Van de Loo, FAJ. (1999). Role of tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis*, 58, (SI): 140-148.
- Van den Bosch, F., Kruithof, E., Baeten, D., De Keyser, F., Mielants, H. & Veys, E.M. (2000a). Effects of a loading dose regimen of three infusions of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (infliximab) in spondyloarthritis: an open pilot study. *Ann Rheum Dis*, 59, 428-33.
- Van den Bosch, F., Kruithof, E., Baeten, D., Herssens, A., de Keyser, F., Mielants, H. & Veys, E.M. (2002). Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (infliximab) versus placebo in active spondylarthritis. *Arthritis Rheum*, 46, 755-65.
- Van den Bosch, F., Kruithof, E., De Vos, M., De Keyser, F. & Mielants, H. (2000b). Crohn's disease associated with spondyloarthritis: effect of TNF- alpha blockade with infliximab on articular symptoms. *Lancet*, 356, 1821-2.
- van der Linden, S., Valkenburg, H.A. & Cats, A. (1984). Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*, 27, 361-8.
- van der Linden, S.M., Khan, M.A., Rentsch, H.U., Gerber, N., Cats, A., Valkenburg, H.A. & Tugwell, P.X. (1988). Chest pain without radiographic sacroiliitis in relatives of patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*, 15, 836-9.
- Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 10, 411-52.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. & Boldin, M.P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, 17, 331-67.
- Ward, M.M. (2002). Functional disability predicts total costs in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 46, 223-31.
- Whelan, M.A. & Archer, J.R. (1993). Chemical reactivity of an HLA-B27 thiol group. *Eur J Immunol*, 23, 3278-85.
- Wittwer, H., Gruber, R., Landauer, N., Koroknay, A., Schattenkirchner, M. & Kellner, H. (2001). Anti-TNFalpha therapy causes upregulation of HLA-B27 expression in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*, 44, S225.
- Wittwer, H., Kellner, H. & Schattenkirchner, M. (2003). Sichere und effiziente Therapie mit Infliximab in der Rheumatologie: Ein teilstationäres Modell. *Akt Rheumatol*, 28, 49-52.
- Wittwer, H., Schattenkirchner, M. & Kellner, H. (2002). Therapie der progressiven systemischen Sklerose (PSS) mit TNFalpha-Blockern - ein Fallbericht. *Z Rheumatol*, 61, I/67.
- Wright, V. (1978). Seronegative polyarthritis: a unified concept. *Arthritis Rheum*, 21, 619-33.
- Wuorela, M., Jalkanen, S., Kirveskari, J., Laitio, P. & Granfors, K. (1997). *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 alters the expression of serologic HLA-B27 epitopes on human monocytes. *Infect Immun*, 65, 2060-6.

- Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J. & Vadas, M.A. (1998). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14196-201.
- Yabkowitz, R., Meyer, S., Black, T., Elliott, G., Merewether, L.A. & Yamane, H.K. (1999). Inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation. *Blood*, 93, 1969-79.
- Zhang, H.G., Wang, Y., Xie, J.F., Liang, X., Liu, D., Yang, P., Hsu, H.C., Ray, R.B. & Mountz, J.D. (2001). Regulation of tumor necrosis factor  $\alpha$ -mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by the protein kinase Akt. *Arthritis Rheum*, 44, 1555-67.
- Zink, A., Braun, J., Listing, J. & Wollenhaupt, J. (2000). Disability and handicap in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis - results from the German rheumatological database. German Collaborative Arthritis Centers. *J Rheumatol*, 27, 613-22.
- Zou, J., Rudwaleit, M., Brandt, J., Thiel, A., Braun, J. & Sieper, J. (2003). Down-regulation of the nonspecific and antigen-specific T cell cytokine response in ankylosing spondylitis during treatment with infliximab. *Arthritis Rheum*, 48, 780-90.
- Zou, J.X., Braun, J. & Sieper, J. (2002a). Immunological basis for the use of TNF $\alpha$ -blocking agents in ankylosing spondylitis and immunological changes during treatment. *Clin Exp Rheumatol*, 20, S34-7.
- Zou, W., Schwartz, H., Endres, S., Hartmann, G. & Bar-Shavit, Z. (2002b). CpG oligonucleotides: novel regulators of osteoclast differentiation. *Faseb J*, 16, 274-82.

## **VIII. ANHANG**

### **VIII.1. VISUELLE ANALOGSKALEN**

Die visuellen Analogskalen entsprechen in naturgetreuem Maßstab einer Länge von 10 cm.  
Der erreichte Punktwert entspricht dem bis zur Markierung ausgemessenen Wert in cm.

#### **VIII.1.1. BASDAI**

**Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen, indem Sie auf der Linie an entsprechender Stelle eine Markierung setzen.**

**Die Fragen beziehen sich auf die letzte Woche.**

1. Wie würden Sie Ihre allgemeine Müdigkeit und Erschöpfung beschreiben?

keine

sehr stark

2. Wie stark waren Ihre Schmerzen in Nacken, Rücken oder Hüfte?

keine

sehr stark

3. Wie stark waren Ihre Schmerzen oder Schwellungen in anderen Gelenken?

keine

sehr stark

4. Wie würden Sie insgesamt die Beeinträchtigung durch druck- oder berührungsempfindliche Körperregionen beschreiben?

keine

sehr stark

5. Wie ausgeprägt war Ihre Morgensteifigkeit nach dem Aufwachen?

keine

sehr stark

6. Wie lange dauerte diese Morgensteifigkeit im allgemeinen?

0

1/2

1

1 1/2

2 Stunden oder länger

**BASDAI**

Auswertung: Bildung eines Mittelwerts aus Frage 5 und 6, Addition dieses Mittelwerts zu den Fragen 1 - 4 und Division durch 5 ergibt den BASDAI-score.

## VIII.I.2. BASFI

**Kreuzen Sie bitte an, wie gut Sie während der letzten Woche die jeweiligen Tätigkeiten allein, also ohne fremde Hilfe oder Hilfsmittel ausführen konnten.**

1. Ohne Hilfe und Hilfsmittel (z.B. Strumpfanzieher) Socken oder Strümpfe anziehen

einfach

unmöglich

2. Ohne Hilfe von der Hüfte aus nach vorne beugen, um einen Kugelschreiber vom Boden aufzuheben

einfach

unmöglich

3. Ohne Hilfe (z.B. Greifzange) etwas von einem hohen Regal herunternehmen

einfach

unmöglich

4. Von einem Stuhl ohne Armlehne aufstehen, ohne dabei die Hände oder andere Hilfe zu benutzen

einfach

unmöglich

5. Ohne Hilfe vom Boden aufstehen, wenn Sie auf dem Rücken liegen

einfach

unmöglich

6. Ohne Beschwerden 10 Minuten stehen, ohne sich anzulehnen

einfach

unmöglich

7. 12 - 15 Treppenstufen steigen ohne Benutzung des Geländers oder von Gehhilfen. 1 Schritt pro Stufe

einfach

unmöglich

8. Über die Schulter sehen, ohne den Oberkörper zu drehen

einfach

unmöglich

9. Körperlich anstrengende Tätigkeiten verrichten (z.B. krankengymnastische Übungen, Gartenarbeit, Sport)

einfach

unmöglich

10. Zu Hause oder bei der Arbeit den ganzen Tag aktiv sein

einfach

unmöglich

**BASFI**

Auswertung: Addition aller Werte und Bildung des Mittelwerts ergibt den BASFI-score.



**VIII.1.3. Schmerzscore**

Wie würden Sie die Stärke Ihrer Schmerzen insgesamt in den letzten 7 Tagen einschätzen?

keine

sehr stark

Schmerzscore

**VIII.1.4. Globales Patientenurteil**

Wie aktiv ist die Krankheit im Augenblick?

inaktiv

hoch aktiv

globales Patientenurteil

**VIII.1.5. Globales Arzturteil**

Wie aktiv ist die Krankheit im Augenblick?

inaktiv

hoch aktiv

globales Arzturteil

**VIII.2. VERMESSUNGSINDEX (BASMI)**

Punktwert	0	1	2
Tragus-Wand-Abstand <sup>1</sup>	< 15 cm	15 - 30 cm	> 30 cm
Lumbale Flexion <sup>2</sup>	> 4 cm	2 - 4 cm	< 2 cm
Cervicale Rotation <sup>3</sup>	> 70°	20 - 70°	< 20°
Laterale lumbale Flexion <sup>4</sup>	> 10 cm	5 - 10 cm	< 5 cm
Intermalleoläre Distanz <sup>5</sup>	> 100 cm	70 - 100 cm	< 70 cm

<sup>1</sup>Kopf maximal zur Wand geführt, normale Kinnhaltung

<sup>2</sup>Anteriore Flexion (Spina iliaca posterior 10 cm nach cranial, 5 cm nach caudal gemessen in aufrechter Körperhaltung); Zunahme nach Flexion ergibt den Wert

<sup>3</sup>Mittelwertbildung aus rechter und linker Rotation

<sup>4</sup>Herunterfahren der Mittelfinger am Oberschenkel, Messen der Differenz aus Start- und Endpunkt, Mittelwertbildung aus rechter und linker Flexion

<sup>5</sup>Der stehende Patient spreizt bei gestreckten Knien die Beine maximal

### VIII.3. STATISTIK

#### VIII.3.1 Berechnung der Standardabweichung (zu III.2.1., Abb.7 und 8)

Standardabweichung Verumgruppe (in Woche 54 und 60 zusätzlich Auslassversuchsgruppe)

Woche	-6	0	2	6	12	14	18	24	30	36	42	48	54	60
<b>BASDAI</b>	1,0	1,4	2,5	1,7	1,4	1,1	1,6	1,9	2,0	2,0	2,0	1,9	0,3/1,6	0,1/1,3
<b>Schmerz</b>	2,5	2,5	2,4	2,1	1,2	1,2	1,5	2,2	2,6	2,3	1,8	1,9	0,0/2,1	0,0/1,6
<b>GIpaUrt</b>	2,0	2,1	2,1	1,9	0,9	1,5	1,3	2,6	2,3	2,5	2,0	1,7	0,0/1,4	0,0/1,5
<b>GIaUrt</b>	1,6	2,1	2,0	2,0	1,6	1,5	1,2	1,7	3,0	2,6	1,7	2,6	0,0/1,6	0,0/2,6
<b>BASFI</b>	1,4	1,2	1,5	2,2	1,3	0,8	1,0	1,3	1,5	1,9	1,5	1,5	0,9/2,3	0,5/2,0
<b>BASMI</b>	2,5	2,2	2,1	1,9	2,1	1,0	2,2	1,9	1,7	1,8	1,5	1,5	0,5/1,6	0,5/1,6

Standardabweichung Placebo-/Verumgruppe

Woche	-18	-12	-10	-6	0	2	6	12	18	24	30	36	42	48
<b>BASDAI</b>	1,8	1,8	1,4	1,1	1,1	1,3	1,2	1,5	1,0	1,3	1,8	1,6	1,3	1,4
<b>Schmerz</b>	0,8	1,3	0,8	1,1	1,6	1,4	1,5	1,5	1,6	1,3	2,2	1,5	1,5	1,8
<b>GIpaUrt</b>	1,2	1,2	0,8	0,8	0,7	1,5	1,7	1,1	1,3	1,3	2,2	1,5	1,2	1,5
<b>GIaUrt</b>	1,4	1,8	1,3	1,5	2,3	1,5	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,7	1,7
<b>BASFI</b>	1,9	1,8	1,9	2,0	2,2	1,9	2,1	2,2	2,3	2,4	2,2	2,8	2,8	2,6
<b>BASMI</b>	1,2	1,5	1,5	1,5	1,8	1,4	1,2	1,5	1,4	1,5	1,8	1,5	1,5	1,5

#### VIII.3.2. Berechnung der Signifikanz (zu III.3.1 und III.3.2)

Signifikanz der HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expressionszunahme, berechnet anhand des single sample t test. Verglichen sind jeweils die FL-Werte vor Therapie und nach 10 Infusionen.

Signifikanz liegt vor bei  $p < 0,05$ .

Single sample t test

(nach Shapiro-Wilk W test liegt kein Beweis gegen Normalverteilung vor)

	T-Lymphozyten	NK-Zellen	B-Lymphozyten
<b>FD705</b>			
einseitiges p	0,03	0,04	< 0,0001
zweiseitiges p	0,05	0,09	0,0001
<b>ABCm<sup>3</sup></b>			
einseitiges p	0,01	0,003	0,0004
zweiseitiges p	0,03	0,01	0,0001
<b>Me1</b>			
einseitiges p	0,0001	0,0002	0,0001
zweiseitiges p	0,0003	0,0004	0,0003
<b>W6/32</b>			
einseitiges p	0,07	0,01	0,001
zweiseitiges p	0,14	0,01	0,003

**VIII.3.3. Berechnung der Korrelation** (zu III.3.1. und III.3.2.)Patienten

Korrelation zwischen HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression, berechnet als einfache lineare Regression (r).  
Verglichen sind jeweils die Werte von Woche 0 bis Woche 48.

Signifikante Korrelation liegt vor bei  $(r) \geq 0,8$

	<b>T-Lymphozyten</b>	<b>NK-Zellen</b>	<b>B-Lymphozyten</b>
<b>Korrelationskoeffizient (r) bei FD705 zu W6/32 zweiseitiges p</b>	0,4 0,001	0,6 < 0,0001	0,5 < 0,0001
<b>(r) bei ABCm<sup>3</sup> zu W6/32 zweiseitiges p</b>	0,1 0,4	0,4 0,0002	0,3 0,008
<b>(r) bei Me1 zu W6/32 zweiseitiges p</b>	0,4 0,001	0,4 0,0001	0,5 < 0,001

Korrelation zwischen den FL-Verläufen der 3 HLA-B27-AK, berechnet als multiple lineare Regression (R).  
Verglichen sind jeweils die Werte von Woche 0 bis Woche 48.

Signifikante Korrelation liegt vor bei  $(R) \geq 0,8$

<b>Multipler Korrelationskoeffizient (R) bei FD705 zu ABCm<sup>3</sup> zu Me1 zweiseitiges p</b>	<b>T-Lymphozyten</b>	<b>NK-Zellen</b>	<b>B-Lymphozyten</b>
	0,8 < 0,0001	0,9 < 0,0001	0,9 < 0,0001

HLA-B27-Positivkontrollen

Korrelation zwischen HLA-B27- und MHC-Klasse-I-Expression, berechnet als einfache lineare Regression (r).  
Verglichen sind jeweils die FL-Werte von Woche 0 bis Woche 48.

Signifikante Korrelation liegt vor bei  $(r) \geq 0,8$

	<b>T-Lymphozyten</b>	<b>NK-Zellen</b>	<b>B-Lymphozyten</b>
<b>Korrelationskoeffizient (r) bei FD705 zu W6/32 zweiseitiges p</b>	0,4 0,001	0,4 0,004	0,2 0,004
<b>(r) bei ABCm<sup>3</sup> zu W6/32 zweiseitiges p</b>	0,4 0,02	0,6 0,005	0,1 0,005
<b>(r) bei Me1 zu W6/32 zweiseitiges p</b>	0,1 0,05	0,2 0,04	0,4 0,04

<b>Name</b>	<b>Heidrun Wittwer</b>
Geburtsdatum	07.09.1970
Geburtsort	Hindelang
Familie	Eltern Alfred und Elisabeth Wittwer Schwester Sylvia, geb. 1969, verheiratet, 3 Kinder
Grund- und Hauptschule	1976 bis 1982 in Hindelang
Staatliche Realschule	1982 bis 1986 in Sonthofen, Mittlere Reife 1986
Gymnasium	1986 bis 1990 in Sonthofen, Abitur 1990
Ordenseintritt	1990  in die Kongregation der Barmherzigen Schwestern vom Heiligen Vinzenz von Paul, Mutterhaus Augsburg Ordensname: Schwester M. Samuela
Ausbildung zur Ordensschwester	1990 bis 1993
Krankenpflegeausbildung	1993 bis 1996 im Zentralklinikum Augsburg
Tätigkeit als Krankenschwester	1996 im Krankenhaus St. Vinzenz in Pfronten
Medizinstudium	Frühjahr 1997 bis Herbst 2003 an der LMU München  PJ im Zentralklinikum Augsburg (Chirurgie und Innere Medizin) und in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie München
Dissertation	2000 bis 2003
Ärztlicher Einsatz in Uganda	Frühjahr 2004
Ärztin im Praktikum	seit 1. Juni 2004 in der I. Medizinischen Klinik des Zentralklinikums Augsburg bei Prof. Dr. med. Wolfgang von Scheidt

Allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren,  
möchte ich an dieser Stelle herzlich danken

Herrn Prof. Dr. med. Herbert Kellner für die Überlassung des Themas und die lehrreiche Zeit in der Rheumaeinheit über die Dissertation hinaus

Herrn PD Dr. med. Rudolf Gruber für die Unterstützung bei der Erhebung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten und bei der Fertigstellung der Arbeit

Herrn Armin Koroknay für die Unterstützung im Labor

Herrn Dr. med. Hans Bruijnen für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung

Meiner Ordensgemeinschaft für die Ermöglichung der Dissertation